



TITLE:

ベンゾイルフェニルウレア系殺虫
剤の定量的構造活性相関と作用機
構に関する研究(Dissertation_全文
)

AUTHOR(S):

中川, 好秋

CITATION:

中川, 好秋. ベンゾイルフェニルウレア系殺虫剤の定量的構造活性相関
と作用機構に関する研究. 京都大学, 1988, 農学博士

ISSUE DATE:

1988-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r6420>

RIGHT:

ベンゾイルフェニルウレア系殺虫剤の定量的構造活性相関と 作用機構に関する研究

1987年

中 川 好 秋

ベンゾイルフェニルウレア系殺虫剤の定量的構造活性相関と
作用機構に関する研究

1987年

中 川 好 秋

目次

	頁
緒論	1
第1章 ニカメイチュウに対する殺虫活性	5
1-1 緒言	5
1-2 実験方法	5
1-2-1 ニカメイチュウの無菌飼育	6
1-2-2 殺虫試験	6
(1) 活性検定用培地の調製	6
(2) 経口投与方法	7
(3) 局所投与方法	7
1-2-3 化合物	7
1-2-4 置換基の物理化学的パラメーター	8
(1) 電子的パラメーター	8
(2) 疎水性パラメーター	9
(3) 立体パラメーター	12
1-3 実験結果	13
1-3-1 殺虫活性と代謝阻害剤の効果	13
(1) フェニル部	13
(2) ベンゾイル部	21
(3) ウレア架橋部	25
1-3-2 定量的構造活性相関	26
(1) フェニル部	26
(2) ベンゾイル部	28
1-4 考察	30
第2章 カイコおよびその他の昆虫に対する殺虫活性	36
2-1 緒言	36
2-2 実験方法	36
2-3 実験結果	37
2-3-1 殺虫活性と代謝阻害剤の効果	37
2-3-2 定量的構造活性相関	38
2-4 考察	40

第3章 ニカメイチュウ表皮培養系における表皮形成阻害活性	46
3-1 緒言	46
3-2 実験方法	46
3-2-1 表皮形成阻害活性の測定	46
3-2-2 化合物	47
3-3 実験結果	47
3-3-1 表皮形成阻害活性と代謝阻害剤の効果	47
3-3-2 定量的構造活性相関	51
(1) フェニル部	51
(2) ベンゾイル部	52
3-3-3 殺虫活性と表皮形成阻害活性との定量的関係	52
3-4 考察	53
第4章 ニカメイチュウ表皮培養系におけるN-アセチル [^{14}C] グルコサミンの 取り込みによぼす昆虫成育制御物質の効果	55
4-1 緒言	55
4-2 実験方法	55
4-3 実験結果	56
4-3-1 経時的变化	56
4-3-2 表皮培養系におけるN-アセチルグルコサミンの取り込みによ ぼす薬剤の効果	58
(1) ホルモン処理を施さない表皮培養系	58
(2) 脱皮ホルモンを作用させた表皮培養系	59
4-3-3 表皮培養系において取り込まれたN-アセチルグルコサミンの形態	63
4-4 考察	65
第5章 化合物の合成	69
5-1 ベンゾイルフェニルウレア類の合成	69
[A] 2,6-Difluorobenzamide	70
[B] 2,6-Difluorobenzoyl isocyanate	70
[C] (i) <i>p</i> - <i>n</i> -Heptyl nitrobenzene	71
(ii) <i>p</i> -Nitrostilbene	71
[D] (i) <i>p</i> - <i>n</i> -Heptylaniline	71
(ii) <i>N,N</i> -Diethylsulfonylaniline	72
(iii) <i>p</i> -Aminostilbene	72
(iv) <i>p</i> -Phenylsulfonylaniline	72

[E]	<i>p</i> -(<i>p</i> -Methylphenethyl)aniline	72
[F]	2,6-Difluorobenzoyl-4-chlorophenylurea	73
[G]	2,6-Dibromobenzonitrile	73
[H]	(i) 2-Dimethyl-6-fluorobenzonitrile	73
	(ii) 2-Fluoro-6-chlorobenzonitrile	74
[I]	2-Methoxy-6-nitrobenzamide	74
[J]	2-Bromo-6-nitrotoluene	74
[K]	2-Bromo-6-nitrobenzoic acid	75
[L]	2-Bromo-6-nitrobenzamide	75
[M]	2-Cyanobenzamide	75
[N]	2,6-Dibromobenzoyl-4-chlorophenylurea	75
5-2	N-置換ベンゾイルフェニルウレア類の合成	76
	(i) 1-Methyl-1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl)urea	76
	(ii) 1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-methyl-3-(4-chlorophenyl)urea	76
	(iii) 1-Methyl-1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-methyl-3-(4-chlorophenyl)urea	76
5-3	DEF(S, S, S-Tributylphosphorotriithioate)の合成	76
第6章	総括	77
謝辞	79
引用文献	80
論文発表	86

農薬のなかでも殺虫剤は、戦後防疫用として、また農作物保護用として極めて大きい役割を果たしてきたが、その一方で、環境汚染を引き起こし深刻な社会問題を提起したことも事実である。したがって、今後の農薬の開発においては、適当な残留性を示すのみで環境汚染を起こさず、微量で高い活性を示す化合物を目標とすべきであり、目的とする病害虫および雑草に対してのみ有効で、人類を含む哺乳動物に対してはできるだけ毒性が低く、すぐれた選択性を示すことが要求される。

一般に昆虫は、卵から幼虫・蛹を経て成虫へと変態するが、いずれの過程においても、キチンとタンパク質とが主成分の表皮を外骨格とし¹⁻³⁾、表皮は伸縮性に乏しいため、特に成長の著しい幼虫期においては数回の脱皮を行う。変態・脱皮は前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic hormone, PTTH)、脱皮ホルモン (Molting hormone, MH)、幼若ホルモン (Juvenile hormone, JH) の巧みな作用によって引き起こされる⁴⁻⁶⁾。すなわち、側心体から分泌された PTTH は前胸腺を刺激し MH が分泌される。MH はアラタ体から分泌された JH とともに作用して、幼虫・蛹および成虫への変態を引き起こす (Fig. 1)。

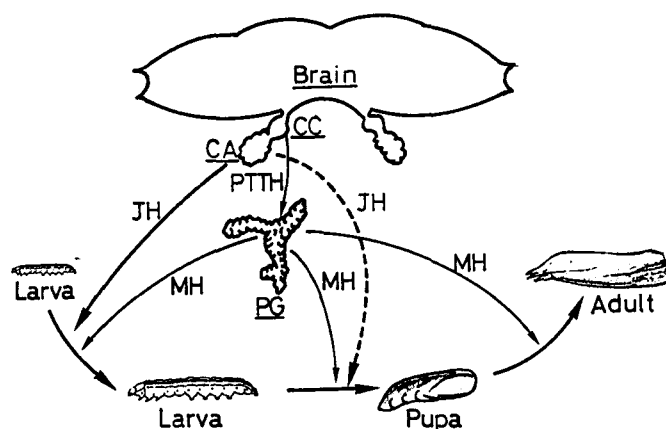
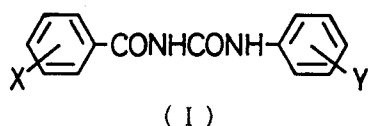


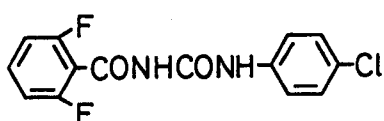
Fig. 1. Hormonal control of molting and metamorphosis in holometabolous insect.

このように、害虫を含む昆虫においては、他の多くの動物とは異なって、変態・脱皮および新しい表皮の形成がその成長過程に重要な役割を担っており、ホルモンの生合成を阻害する物質⁷⁻⁹⁾、ホルモンと拮抗する物質¹⁰⁻¹²⁾、さらには表皮の形成を阻害する物質¹³⁾は選択性の高い殺虫剤になりうる。

1972年にオランダのPhilips Duphar社において除草剤開発中に合成されたベンゾイルフェニルウレア (I) は、脱皮を阻害することによって殺虫効果を示すものであることが明らかにされた。¹³⁾



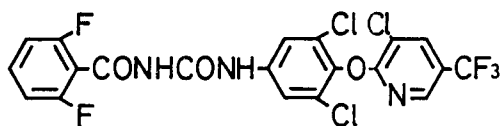
それ以来、多数のベンゾイルフェニルウレア誘導体の合成が行われ、実用化されるか、あるいはその途上にあるものとして、ジフルベンズロン¹⁴⁾、トリフルムロン^{15, 16)}、クロルフルアズロン¹⁷⁾、テフルベンズロン¹⁸⁾ が挙げられる。



ジフルベンズロン



トリフルムロン



クロルフルアズロン



テフルベンズロン

ベンゾイルフェニルウレア系化合物が高い殺虫活性を示すためには、ベンゾイル部のオルト位の両方、あるいは片方に塩素あるいはフッ素が置換していること、また、フェニル部のパラ位に電子吸引性基の存在することの望ましいことは知られていた^{14, 19, 20)}。しかし、どうしてそのような構造上の条件が要求されるかについては未解決の問題が残されていた。

作用機構の解明についても多くの研究が行われ²¹⁻⁵⁰⁾、昆虫個体レベルおよび細胞レベルにおいてキチンの蓄積を抑えることが明らかにされた²¹⁻⁴¹⁾。しかし昆虫あるいは昆虫表皮から調製されたセルフリーのキチン合成酵素標品に対しては阻害効果を示さない³⁷⁻⁴²⁾。また、キチン合成酵素の阻害ではなく、キチン生合成経路 (Fig. 2) の初期段階 (glucose → fructose-6-P)⁴⁴⁾、キチン合成酵素チモーゲンの活性化⁴⁵⁾、キチナーゼおよびフェノールオキシダーゼの活性化⁴⁶⁾ などの阻害が観察されていて、殺虫活性発現の機構は未だに明らかになっていない。

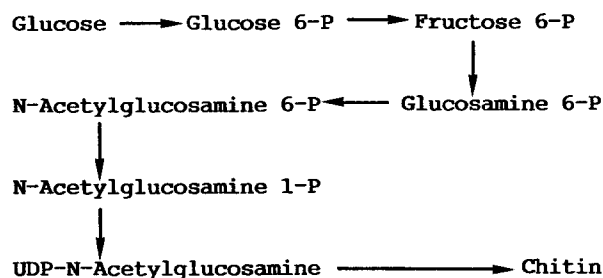
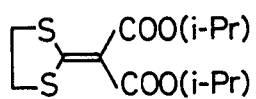
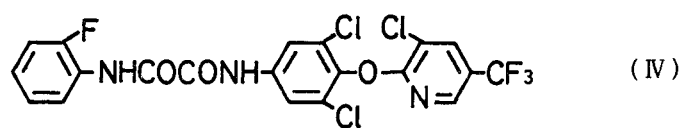
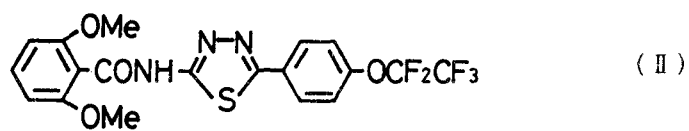


Fig. 2. Biosynthetic pathway of chitin.

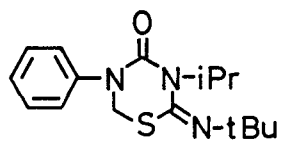
本論文は、多数の置換ベンゾイルフェニルウレア誘導体を合成し、すぐれた活性発現に要求される構造上の条件を明らかにしようと試みた結果をとりまとめたものである。すなわち、ベンゾイル部のオルト位およびフェニル部のパラ位における置換基の効果をHansch-Fujita 法⁵⁹⁾により定量的に解析し、本系列化合物の活性の発現機構を物理化学的に解明するとともに、構造活性相関解析を基盤に作用機構に対して検討を加え、さらに定量的構造活性相関の解析結果から高活性化合物のデザイン合成をも行った。

ベンゾイルフェニルウレア類の殺虫活性が明らかにされて以来、構造的に類似したベンゾイルアミノチアジアゾール類(Ⅱ)⁶⁰⁻⁶⁴⁾、チオセミカルバジド類(Ⅲ)⁶⁵⁻⁶⁸⁾、オキザリルジアニリド類(Ⅳ)⁶⁹⁾にも同様の脱皮阻害活性がみいだされた。また殺菌剤として実用化されているイソプロチオラン⁷¹⁾にもウンカに対して脱皮阻害活性が認められ^{71, 72)}、この構造を基本にデザインされたブプロフェジン⁷³⁻⁷⁶⁾はウンカの防除剤として実用化されるに至った。さらに、複素環化合物や天然物の中に多数の脱皮阻害物質⁷⁷⁾が見出され、メトプレン⁷⁸⁾やアレコセン⁸⁾に代表される変態阻害物質が開発されてきている。

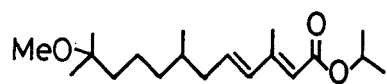
このように、最近では、脱皮・変態を阻害する物質が、速効性には欠けるものの選択性に優れた新たな作用機構を示す殺虫剤として注目されている。これらの化合物は、神経系に働く殺虫剤などに対して抵抗性の現れた昆虫にも効果的に利用できる可能性があり、今後ますます開発が進むものと考えられる。このような現状で、脱皮阻害物質の代表的化合物であるベンゾイルフェニルウレア類の構造活性相関、ならびに作用機構に関する研究は重要な意義をもつものと考えられる。



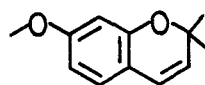
イソプロチオラン



ブプロフェジン



メトプレレン



プレコセン

第1章 ニカメイチュウに対する殺虫活性

1-1 緒言

ニカメイチュウは鱗翅目昆虫であるニカメイガ (*Chilo suppressalis*) の幼虫で、世界的に稲作に大きな被害をもたらしてきた。最近の我が国では、農業の機械化に伴い、あるいは田植えの時期が早くなることによって全国的な大発生はほとんど見られなくなったけれども、局地的には依然として被害をもたらしている⁷⁹⁾。ニカメイチュウの人工飼育は芽出し稲を用いて行うことができるが、その飼育方法は以前は極めて煩雑で手間がかかった⁸⁰⁾。石井らは人工飼料の研究を行ない、ガラス容器内で適当な人工飼料を用いることにより大量飼育が容易行えることを示した^{81)・82)}。現在では、人工飼料で飼育したニカメイチュウを、極めて簡便に殺虫試験などの生物検定に用いることができるようになっている。

本研究においては、無菌的に飼育したニカメイチュウに薬剤を経口的、あるいは局所的に投与することによって各種置換ベンゾイルフェニルウレア類の殺虫活性を求めた。この際、薬物の解毒代謝をできるだけ抑えるために、酸化的代謝、および加水分解代謝に対する阻害剤⁸³⁾を併用し、これらの共力効果についても検討を加えた。そして殺虫活性の大きさの変化を置換基の物理化学的パラメーターを用いて定量的に解析し、活性の発現にとって必須の構造上の条件について明らかにするとともに、解析結果に基づいて高い殺虫活性を有する化合物をデザイン合成した。

1-2 実験方法

1-2-1 ニカメイチュウの無菌飼育⁸⁴⁾

ニカメイガ卵を市販の次亜塩素酸ソーダ (アンチホルミン) の 20 倍希釈液 (min. Cl conc. 0.25%) で 10 - 15 分間殺菌し、70% エタノールでアンチホルミンを洗った後、オートクレーブで高圧蒸気滅菌 (1.2 kgf/cm², 30 min) した人工飼料 (Table 1) を含む三角フラスコ上部に無菌条件下で植え付け、インキュベーター (サンヨー MIR250) 内で飼育した。人工飼料は Table 1 に示した試薬などから調合し、その中で用いた salt mixture は Table 2 に記載した特級試薬およびビタミン等から調製した。長日条件下 (16 時間照明) 28℃ で最終令まで飼育した後、人工飼料を含むシャーレに移し、彷徨期 (wandering stage) に達した幼虫を取り出してティッシュペーパーを折り重ねて入れたシャーレに移し

た。蛹になったものを取り出し、約30頭の蛹を、水で湿らせた脱脂綿および襷をつけた硫酸紙を入れたプラスチックケース（30×20×15cm）内で羽化させた。硫酸紙に産みつけられた卵を切り取り、次世代の飼育に用いた。

Table 1. Composition of the diet for the rice stem borer (g/50 ml Water)

Cellulose	1.0 g	Dry yeast	1.0
Agar	1.0	Salt mixture ^{a)}	0.4
Glucose	0.5	Sodium ascorbate	0.3
Sucrose	0.5	Cholesterol	0.02
Casein	1.5	Choline chloride	0.05
Chlorella	1.0	L-Cystein-HCl	0.03
Wheat bram	1.0		

a) Composition of salt mixture is shown in Table 2.

Table 2. Composition of the salt mixture used for the diet for rice stem borer

K ₂ HPO ₄	39.8 g	Thiamine HCl	40 mg
KH ₂ PO ₄	14.4	Riboflavine	20
MgSO ₄ (7H ₂ O)	26.2	Nicotinic acid	40
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ (H ₂ O)	6.4	Pyridoxine HCl	20
NaCl	4.0	Ca-Panthoteinate	40
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (6H ₂ O)	1.6	Folic acid	4
MnSO ₄ (H ₂ O)	0.4	Biotin	4
Zn(OAc) ₂ (2H ₂ O)	0.4	p-Aminobenzoic acid	40
CuSO ₄ (5H ₂ O)	0.2	Inositol	400

1-2-2 殺虫試験

(1) 活性検定用培地の調製

人工飼料(Table 1)16.6 g と 100 ml の蒸留水を三角フラスコに入れてオートクレーブで滅菌し、よく振り混ぜた後、寒天が固化しないうちに滅菌したガラスシャーレ（直径 6.5 cm）に流し出した。代謝阻害剤は、そのエタノール溶液 100μl を、後に示す経口投法を用いる場合には、ベンゾイルフェニルウレア類を種々の濃度で含むジメチルスルホキシド(DMSO)溶液10μl をオートクレーブで滅菌した直後の人工飼料に、寒天の固まらないうちに添加してよく振り混ぜた後、同様にシャーレに流し出した。酸化的代謝阻害剤ペロニルブトキシド(PB)の影響を調べるために、各種濃度のPBを含む人工飼料でそれぞれ約50頭の第3令幼虫を飼育した後、幼虫の体重を計測した。幼虫1頭あたりの体重を求めてその値を縦軸に、横軸にPBの濃度をとって、片対数プロットするとFig. 3に示す dose-

response-curveが得られた。この結果から、飼料中における濃度が $100\ \mu\text{M}$ を越えると成育が顕著に抑えられることがわかり、以下の殺虫試験においてPBは $100\ \mu\text{M}$ の濃度で用いた。加水分解代謝阻害剤であるDEFもPBの濃度に合わせて $100\ \mu\text{M}$ とした。

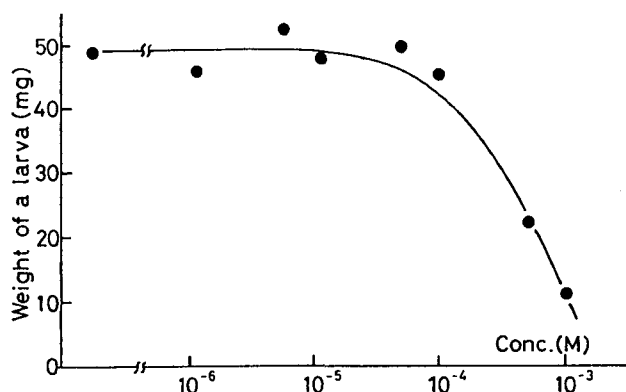


Fig. 3. Effect of PB on the growth inhibition of larvae.

(2) 経口投与方法

1-2-1の方法で無菌飼育した孵化後約10日の第3令非休眠幼虫を、(1)で調製した種々の濃度の薬剤を含む検定用培地に移し、長日条件下 $28\ ^\circ\text{C}$ で無菌飼育を行った。一週間後に、各薬剤の各濃度における致死率を求め、dose-response-curve から中央有効濃度 LC_{50} (M) をプロビット変換法⁸⁵⁾により求めた。活性の指標にはその逆対数 pLC_{50} を用いた。

(3) 局所投与方法

1-2-1の方法で無菌飼育した孵化後約10日の第3令非休眠幼虫を(1)で調製した薬剤を含まない培地に移し、代謝阻害剤のみを含む人工飼料をまず1時間以上摂食させた。次に種々の濃度の薬剤をDMSO溶液にて $0.5\ \mu\text{l}$ ずつ幼虫の腹部背板に局所投与し、長日条件下 $28\ ^\circ\text{C}$ で無菌飼育を行った。5日後に各種薬剤の各薬量における致死率を求め dose-response-curveから中央致死薬量 LD_{50} (mmol/insect)をプロビット変換法⁸⁵⁾により求めた。活性の指標にはその逆対数 pLD_{50} を用いた。

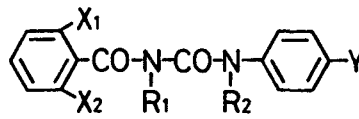
1-2-3 化合物

第5章に示す方法に従って種々のオルト置換ベンゾイル誘導体 ($\text{V} : \text{Y} = \text{Cl}$) およびパラ置換フェニル誘導体 ($\text{V} : \text{X}_1 = \text{X}_2 = \text{F or Cl}$)、さらにウレア架橋部をアルキル化した

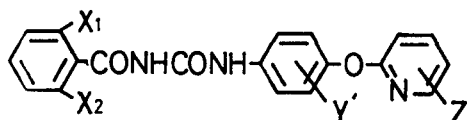
誘導体 (VI) を合成した。ベンジルオキシ誘導体 (V: $X_1 = X_2 = \text{F}$, $Y = \text{OCH}_2\text{Ph}(Z)$) は住友化学より、クロルフルアズロン類縁体 (VII) は石原産業より恵与を受けた。酸化的代謝阻害剤ピペロニルブトキシド (PB) (VIII) は市販の特級試薬をそのまま使い、加水分解代謝阻害剤 DEF (S, S, S-tributylphosphorotriithioate) (IX) は第5章に示す方法に従って合成した。酸化的代謝阻害剤 Sesamex (X) は住友化学より提供を受けた。



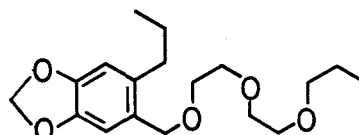
(V)



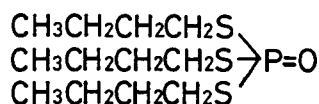
(VI)



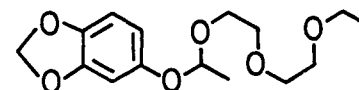
(VII)



(VIII)



(IX)



(X)

1-2-4 置換基の物理化学的パラメーター

(1) 電子的パラメーター

置換基の電子吸引性を表すパラメーターとしては、置換安息香酸の酸解離定数 (K_a) から算出されたハメットの $\sigma^{66)}$ 、および σ から共鳴による電子吸引効果を差し引いた誘起的電子吸引性を表す $\sigma_1^{67)}$ 、あるいは Swain-Lupton-Hansch の F 値⁶⁶⁾ を用いた。複雑な置換基でその値が文献に記載されていない場合は、構造的に類似した置換基のパラメーター値から推算した値を用いた。置換ピリジルオキシ基は構造的に置換フェノキシに類似しているので、 σ_1 値はピリジン環内の $-N=$ をベンゼン環上の置換基とみなして以下のようにして算出した。置換基の σ_1 は α -置換酢酸の pK_a から (1) 式によって定義される⁶⁷⁾。従って置換フェノキシ酢酸の pK_a の文献値⁶⁸⁾ から置換フェノキシ基の σ_1 を求めた。各置換フェノキシ基の σ_1 値は Table 3 に示した。

$$\sigma_I = [\log K_a + 4.79(\text{p}K_a \text{ of } \text{CH}_3\text{COOH})] / 4.05 \quad (1)$$

また、(1) 式から求めた置換フェノキシ基の σ_I とベンゼン環上の置換基の σ^0 との関係に関して(2) 式に示すような直線関係が得られた。

$$\sigma_I (\text{monosubst. phenoxy}) = 0.076 \sigma^0 + 0.397 \quad (2)$$

(0.013) (0.005)

$$n = 25 \quad s = 0.009 \quad r = 0.933 \quad F = 154.6$$

(2) 式および以下の式における n は解析用いた化合物数、 s は標準偏差、 r は相関係数、 F は実測値と計算値の変動の F -比で回帰式の有意性を表している。() 内の数字は各係数の95% 信頼限界を表している。 σ^0 は、フェニル酢酸のように反応中心とベンゼン環とが直接、共鳴に関与しない場合のベンゼン環上の置換基の電子吸引力を表すパラメーターである⁹⁹⁾。 σ_I の計算に用いた置換フェノキシ酢酸の $\text{p}K_a$ およびベンゼン環上の置換基の σ^0 の値はTable 3 に示した。置換ピリジルオキシ基の σ_I 値は、(2) 式にピリジン環上の置換基の σ^0 とピリジン環の-N= 基の $\sigma^0(0.93)^{90)}$ を合計した $\Sigma \sigma^0$ 値を代入して算出した。

Table 3. Physicochemical constants of substituted phenoxy acetic acids

Substituents	$\text{p}K_a$	$\sigma_I^a)$	$\sigma^{0b)}$	Substituents	$\text{p}K_a$	σ_I	σ^0
H	3.17	0.40	0.00	<u>o</u> -F	3.09	0.42	0.17
<u>o</u> -Me	3.23	0.39	-0.12	<u>m</u> -F	3.08	0.42	0.35
<u>m</u> -Me	3.20	0.39	-0.07	<u>p</u> -F	3.13	0.41	0.17
<u>p</u> -Me	3.22	0.39	-0.12	<u>o</u> -Cl	3.05	0.43	0.27
<u>o</u> -OMe	3.23	0.39	-0.16	<u>m</u> -Cl	3.07	0.42	0.37
<u>m</u> -OMe	3.14	0.41	0.06	<u>p</u> -Cl	3.10	0.42	0.27
<u>p</u> -OMe	3.21	0.39	-0.16	<u>o</u> -Br	3.12	0.41	0.26
<u>o</u> -NO ₂	2.90	0.47	0.82	<u>m</u> -Br	3.10	0.42	0.38
<u>m</u> -NO ₂	2.95	0.45	0.70	<u>p</u> -Br	3.13	0.41	0.26
<u>p</u> -NO ₂	2.89	0.47	0.82	<u>o</u> -I	3.17	0.40	0.27
<u>o</u> -CN	2.97	0.45	0.69	<u>m</u> -I	3.13	0.41	0.35
<u>m</u> -CN	3.03	0.43	0.62	<u>p</u> -I	3.16	0.40	0.27
<u>p</u> -CN	2.93	0.46	0.69				

a) σ_I value of substituted phenoxy groups.

b) σ^0 value of substituents on the phenoxy-benzene ring.
Taken from Ref.(89) and (103).

(2) 疎水性パラメーター

置換基Xの疎水性をあらわすパラメーター π は、オクタノール／水系における物質の分配係数から(3) 式によって求められる^{91), 92)}。

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H \quad (3)$$

(3) 式において P_H は基準となる無置換化合物の分配係数である。

モノ置換ベンゼンに関しては多くの置換基の π 値が求められており、分子の疎水性はその値を加え合わせることによって求めることができる。しかし、ジ置換ベンゼンで固定された置換基が水素結合性の置換基である場合には、置換基 X の電子的性質によって π の値は変化する。そこで、このような置換基の π 値を正確に算出するため、(4) 式が用いられる。

$$\pi_X = 0.94 \pi_X (\text{monosubstituted benzene}) + 0.91 \sigma_X \quad (4)$$

(4) 式において σ_X は置換基 X の電子吸引力を表している。このことから、アニリド結合を側鎖にもつベンゾイルフェニルウレア類のフェニル部置換基の疎水性パラメーターの値は(4)式を用いて計算した。モノ置換ベンゼンの置換基の π 値としては文献記載の値を用いたが、その値が無い場合には加成性に基づいて計算した。すなわち、アルキル鎖の延長に伴う疎水性は、 $-\text{CH}_2-$ につき 0.53 を加算した。この値は、Me, Et, n-Pr, n-Bu の π 値の増分を平均したものである。以上のようにして求めた置換基のモノ置換ベンゼンの系における π 値、および(4)式によって補正した π 値を Table 5 に示した。

置換ピリジルオキシアセトアニリドの n-オクタノール/水系における分配係数を測定したところ、5 個の誘導体で Table 4 に示す値が得られた。

Table 4. Partition coefficient (P) of substituted pyridyloxy acetanilides and capacity factor (k') of 2,6-difluorobenzoylpyridyloxyphenylureas

No.	Substituents Z	log k' ^{a)}	log P ^{b)}		m.p.(°C) ^{b)} obsd.
			Obsd.	Calcd.	
53	H	-0.044	1.57	1.59	134 - 136
54	5-CF ₃	0.298	2.80	2.74	149
58	3,5-diCl	0.484	3.27	3.37	173 - 174
62	3-CF ₃ ,5-Cl	0.513	3.50	3.47	183 - 184
64	3-Cl,5-CF ₃	0.524	3.53	3.51	175 - 176

a) The value for the substituted pyridyloxy benzoylphenylureas.

b) The value for the corresponding substituted pyridyloxy acetanilides. Taken from Ref.(17).

疎水性を表す指標として、最近 HPLC の保持時間から算出した Capacity Factor (k') がよく用いられるが⁹⁴⁻⁹⁶⁾、その指標は(5)式によって定義される。

$$\log k' = \log [(t_R - t_0) / t_0] \quad (5)$$

(5) 式において、 t_R , t_0 はそれぞれ試料と非保持物質の保持時間(retention time)である。置換ピリジルオキシ基をフェニル部にもつベンゾイルフェニルウレア類の $\log k'$ 値は、芳賀らによって ODS カラムを用いて、アセトニトリル/水系で求められている¹⁷⁾。置換ピリジルオキシ基をフェニル部にもつベンゾイルフェニルウレア類について求められた $\log k'$ 値と、置換ピリジルオキシアセトアニリドの $\log P$ との間には(6) 式に示す関係が存在した。したがって、実測を行わなかった置換ピリジルオキシアセトアニリドの $\log P$ 値は、すでに求められている $\log k'$ の値を用いて(6) 式から計算した。

$$\log P(\text{acetanilide}) = 3.379 \log k'(\text{benzoylphenylurea}) + 1.734 \quad (6)$$

$$(0.472)$$

$$(0.196)$$

$$n = 5 \quad s = 0.072 \quad r = 0.997 \quad F = 517.9$$

また、本研究においても島津 LC6A 高速液体クロマトグラフィー(カラム; Shim-pack CLC-ODS 0.15 μ m \times 6.0 ϕ ; カラム温度, 45 $^{\circ}$ C; 溶媒, メタノール/水=4/1; 流量 1.5 ml/min; UV検出波長, 254 nm)を用いてベンゾイルフェニルウレア類の $\log k'$ を測定した。

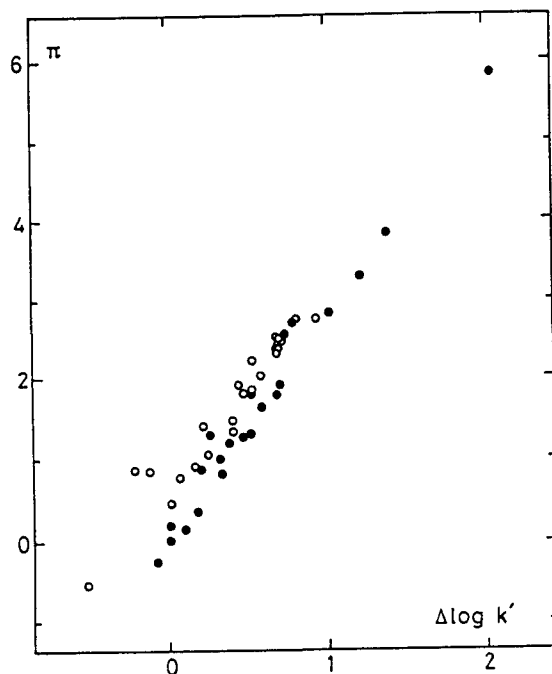


Fig. 4. Relationship between $\Delta \log k'$ values of 2,6-difluorobenzoyl derivatives and π values of corresponding substituents.

ここで、各種ベンゾイルフェニルウレア類はDMSO溶液にてHPLCに注入し、 t_R 値を求め、 t_0 にはDMSOの保持時間を用いた。オルト位の2,6-位をフッ素で固定し、フェニル部のパラ位に各種置換基をもつ誘導体(2,6-F₂ 体)の $\log k'$ 値から、フェニル部が無置換である誘導体(No.8)の $\log k'$ 値を差し引いた $\Delta \log k'$ を求め、 π 値との関係を調べたところ両者の間には Fig. 4 に示すような関係が認められた。また、各種置換基をフェニル部にもつ2,6-ジフルオロベンゾイル誘導体(2,6-F₂ 体)の $\Delta \log k'$ をTable 4 に併記した。Fig. 4 において●は非水素結合性の、○は水素結合性の置換基を表している。この結果から、●の化合物に関しては、 π の代わりに $\Delta \log k'$ を用いても大差のないことが示される。

ベンゾイル部のオルト置換基の疎水性パラメーターとしては、置換ベンズアミドの n -オクタノール/水系における分配係数より求められた π 値^{97, 98)}を用いた。

(3) 立体パラメーター

立体パラメーターとしては、置換基の立体的形状を方向性に従って表すVerloop の STERIMOLパラメーター⁹⁹⁾を用いた。そのなかで B_5 は、Fig. 5 に示すように置換基の α 原子と分子の他の部分を結ぶ軸に垂直な方向の最も大きい横幅を表すパラメーターで、その値は、Verloop より恵与されたパラメーター表およびプログラムから求めた。解析には、他のパラメーターと基準を同一にするため各置換基の B_5 値から水素原子の B_5 の値を差し引いた ΔB_5 値を用いた。

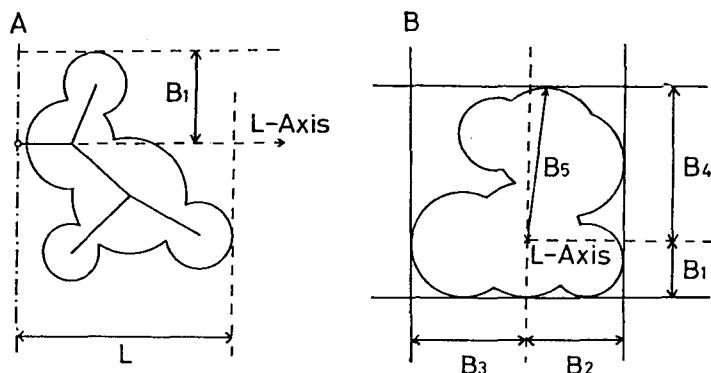


Fig. 5. Schematic representation of STERIMOL parameters. A: Projection of a substituent along the L-axis showing the parameters L and B_1 ; B: Projection of a substituent perpendicular to L-axis showing the five B parameters.

オルト置換基の立体パラメーターとしては、ベンゾイル部と同じ部分構造をもつモノ置換ベンズアミドの酸加水分解速度定数から実験的に得られ、新しく定義された Es^0 値¹⁰⁾を用いた。

以上の方法で求めた各種物理化学的パラメーターの値はTable 5 およびTable 6 に示した。

1-3 実験結果

1-3-1 殺虫活性と代謝阻害剤の効果

(1) フェニル部

共力剤存在下で求めた比較的簡単な置換基をもつ誘導体の殺虫活性をTable 7 に示した。経口投与法と局所投与法によって求めた両殺虫活性間の関係を定量的に解析した結果、(7) 式および(8) 式が得られた。

$$pLC_{50}(\text{None}) = 0.904 \quad pLD_{50}(\text{None}) - 0.326 \quad (7)$$

(0.268) (1.569)

$$n = 15 \quad s = 0.270 \quad r = 0.896 \quad F = 52.9$$

$$pLC_{50}(\text{PB}) = 0.986 \quad pLD_{50}(\text{PB}) - 0.735 \quad (8)$$

(0.163) (0.970)

$$n = 28 \quad s = 0.237 \quad r = 0.926 \quad F = 155.3$$

(7) 式における $pLC_{50}(\text{None})$ および $pLD_{50}(\text{None})$ は共力剤を用いないで求めた活性を、(8) 式における $pLC_{50}(\text{PB})$ および $pLD_{50}(\text{PB})$ は酸化的代謝阻害剤(PB)共存下で求めた活性を表している。(7)、(8) 式から明らかなように、共力剤の存在する条件、しない条件で求めた殺虫活性は、投与様式が異なっても互いにほぼ 1 対 1 に対応した。すなわち、経口投与法では幼虫は寒天で固化した人工飼料中潜り込むため薬剤は表皮からも浸透すること、逆に、局所投与法では幼虫の表皮上の試料が人工飼料にも付着するため幼虫はその一部を経口的にも取り込むと考えられ、両試験法が必ずしも独立のものでないことを示している。以下の実験においては殺虫活性の測定は局所投与法を用いて行った。

酸化的代謝阻害剤(PB)の効果はアルキル、アルコキシなどの電子供与性基で置換された誘導体に対して顕著に現れ、加水分解代謝阻害剤(DEF)の効果は電子吸引性の特に強い NO_2 (No.6), CN (No.7), COPh (No.23)誘導体に対して顕著であった。

Table 5. Physicochemical substituent parameters for benzoyl-
(para-substituted)-phenylureas^{a)}

Substituents X	π	$\pi^b)$	σ	F	$\sigma_I^c)$	$\Delta B_S^d)$	$\log k^e)$
F	0.14	0.19	0.06	0.43	0.54	0.35	0.000
Cl	0.71	0.88	0.23	0.41	0.47	0.80	0.245
Br	0.86	1.02	0.23	0.44	0.47	0.95	0.319
I	1.12	1.22	0.18	0.40	0.40	1.15	0.380
CF ₃	0.88	1.32	0.54	0.38	0.40	1.61	0.264
NO ₂	-0.28	0.45	0.78	0.67	0.67	1.44	0.003
CN ²	-0.57	0.06	0.66	0.51	0.57	0.60	-0.243
H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000
Me	0.56	0.37	-0.17	-0.04	-0.01	1.04	0.177
Et	1.02	0.82	-0.15	-0.05	-0.01	2.17	0.337
n-Pr	1.55	1.34	-0.13	-0.06	-0.01	2.49	0.515
i-Pr	1.53	1.30	-0.15	-0.05	0.01	2.17	0.457
n-Bu	2.13	1.86	-0.16	-0.06	-0.01	3.54	0.687
t-Bu	1.98	1.68	-0.20	-0.07	-0.01	2.17	0.585
n-Hex	3.19 ^{f)}	2.85	-0.16 ^{g)}	-0.06 ^{g)}	-0.03	4.96	1.020
n-Hep	3.72 ^{f)}	3.35	-0.16 ^{g)}	-0.06 ^{g)}	-0.04	5.39	1.212
N=NPh	1.69	1.94	0.39	0.28	0.28 ^{h)}	3.31	0.698
OMe	-0.02	-0.26	-0.27	0.26	0.30	2.07	-0.073
OEt	0.38	0.14	-0.24	0.22	0.28	2.36	0.100
OPh	2.08	1.93	-0.03	0.34	0.40	4.89	0.452
Ac	-0.55	-0.06	0.50	0.32	0.30	2.13	-0.223
CO-n-Pr	0.53	0.95	0.50	0.32	0.32 ^{h)}	3.50	0.172
COPh	1.05	1.38	0.43	0.30	0.30 ^{h)}	4.98	0.220
CH ₂ CN	-0.57	-0.53	0.01	0.21	0.20	3.12	-0.502
SO ₂ NEt ₂	0.28 ^{f)}	0.84	0.63 ⁱ⁾	0.42	0.42 ^{h)}	4.39	-0.123
OCH ₂ Ph	1.66	1.35	-0.23	0.25	0.43	2.50	0.400
OCH ₂ Ph(2-F)		1.49 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	3.02	0.406
OCH ₂ Ph(3-F)		1.49 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	3.01	0.400
OCH ₂ Ph(3-Cl)		2.06 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	2.50	0.581
OCH ₂ Ph(2,4-diCl)		2.77 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	3.80	0.903
OCH ₂ Ph(3-CF ₃)		2.23 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	4.10	0.534
OCH ₂ Ph(3,4-diMe)		2.47 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	3.58	0.719
OCH ₂ Ph(3-NO ₂)		1.07 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	4.13	0.248
OCH ₂ Ph(2-CN)		0.78 ^{j)}	-0.23	0.25	0.43	4.32	0.056
O(CH ₂) ₂ Ph	2.19 ^{f)}	1.84	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	6.33	0.526
O(CH ₂) ₂ Ph(4-OMe)		1.82 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	8.12	0.473
O(CH ₂) ₂ Ph(2-Me)		2.40 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	6.33	0.678
O(CH ₂) ₂ Ph(3-Me)		2.40 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	6.79	0.696
O(CH ₂) ₂ Ph(4-Me)		2.40 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	7.41	0.705
O(CH ₂) ₂ Ph(2-Cl)		2.55 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	6.33	0.698
O(CH ₂) ₂ Ph(3-Cl)		2.55 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	6.91	0.665
O(CH ₂) ₂ Ph(4-Cl)		2.55 ^{l)}	-0.24 ^{k)}	0.22 ^{k)}	0.28 ^{k)}	7.75	0.670
O(CH ₂) ₃ Ph	2.72 ^{f)}	2.33	-0.25 ^{m)}	0.22 ^{m)}	0.28 ^{m)}	3.70	0.676
O(CH ₂) ₂ Ph	3.25 ^{f)}	2.76	-0.32 ⁿ⁾	0.25 ⁿ⁾	0.28 ⁿ⁾	7.76	0.814
Ph	1.96	1.83	-0.01	0.08	0.12	2.11	0.525
Ph(4-Cl)	2.67	2.58	0.08	0.08	0.15	2.11	0.728
Ph(4-Br)	2.82	2.72	0.08	0.08	0.15	2.11	0.789
SO ₂ Ph	0.27	0.89	0.70	0.56	0.56	5.02	-0.211
(E)CH=CHPh	2.68	2.46	-0.07	0.06	0.06 ^{h)}	2.38	0.720
(Z)CH=CHPh	2.68	2.46	-0.07	0.06	0.06 ^{h)}	6.07	0.703
n-Oct	4.25 ^{f)}	3.85	-0.16 ^{g)}	-0.06 ^{g)}	-0.04 ^{o)}	6.39	1.368
n-Dod	6.37 ^{f)}	5.84	-0.16 ^{g)}	-0.06 ^{g)}	-0.04 ^{o)}	9.27	2.043

Table 5. (continued)

Substituents							
X	π	$\pi^b)$	σ	F	$\sigma_I^c)$	$\Delta B_5^d)$	$\log k'^e)$
O-2-Py		0.41 ^{p)}			0.47 ^{q)}	4.89	
O-2-Py(5-CF ₃)		1.64 ^{p)}			0.51 ^{q)}	6.46	
O-2-Py(5-Cl)		1.36 ^{r)}			0.49 ^{q)}	6.31	
O-2-Py(5-Br)		1.55 ^{r)}			0.49 ^{q)}	6.61	
O-2-Py(5-I)		1.75 ^{r)}			0.49 ^{q)}	7.00	
O-2-Py(3,5-diCl)		2.11 ^{p)}			0.51 ^{q)}	6.31	
O-2-Py(3,5-diBr)		2.53 ^{r)}			0.51 ^{q)}	6.61	
O-2-Py(3-Me,5-Br)		2.28 ^{r)}			0.48 ^{q)}	6.61	
O-2-Py(3-Cl,5-COOEt)		2.22 ^{r)}			0.52 ^{q)}	8.70	
O-2-Py(3-CF ₃ ,5-Cl)		2.34 ^{p)}			0.53 ^{q)}	6.31	
O-2-Py(3-NO ₂ ,5-CF ₃)		1.33 ^{r)}			0.57 ^{q)}	6.46	
O-2-Py(3-Cl,5-CF ₃)		2.37 ^{p)}			0.53 ^{q)}	6.46	

a) Taken from Ref.(86), unless noted.

b) Estimated from Eq.4.

c) Taken from Ref.(87).

d) Values are either estimated using a program or cited from a brochure both provided by Dr. A. Verloop.

e) The capacity factor (k') was measured by using CH₃OH/H₂O (4/1) mobile phase. The value for substituted 2,6-difluorobenzoylphenylureas.

f) The value was estimated from π value of \underline{n} -Bu by adding $\pi(\text{CH}_3)(= 0.53)$.

g) The value of \underline{n} -Bu was used.

h) The Swain-Lupton-Hansch F value instead of σ_I .

i) Estimated from σ value of \underline{p} -SO₂CH₃ and σ^- values of \underline{p} -SO₂CH₃ and \underline{p} -SO₂N(Et)₂ assuming a linear relationship; values were taken from Ref.(86).

j) Values were estimated from π value (1.35) of OCH₂Ph by adding $\pi(\text{monosubstituted benzene})$ of substituents on benzene ring.

k) The value of OEt was used.

l) Values were estimated from π value (1.84) of O(CH₂)₂Ph by adding $\pi(\text{monosubstituted benzene})$ of substituents on benzene ring.

m) The value of OPr was used.

n) The value of OBu was used.

o) The value of \underline{n} -Hep was used.

p) Values were observed.

q) Estimated from Eq.2.

r) Estimated from Eq.6.

Table 6. Physicochemical substituent parameters for ortho-substituted benzoylphenylureas

Substituents		$\pi^a)$	$\Sigma E_s^{ob)}$	$\Sigma \sigma^c)$	$\Sigma \sigma_I^{d)}$	$\sigma^{#e)}$
X_1	X_2					
H	H	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F	F	-0.39	-0.64	0.12	1.08	1.08
Cl	Cl	0.13	-1.96	0.46	0.94	0.94
Br	Br	0.36	-2.24	0.46	0.94	0.94
Me	Me	0.26	-2.32	-0.34	-0.02	-0.02
Cl	F	-0.15	-1.30	0.29	1.01	1.01
OMe	OMe	-0.86	-0.80	-0.54	0.60	0.60
NO ₂	Me	-0.54	-2.81	0.61	0.66	0.66
Cl	Me	0.25	-2.14	0.06	0.46	0.46
NO ₂	Cl	-0.52	-2.63	1.01	1.14	1.14
NMe ₂	F	-0.02	-1.98 ^{f)}	-0.77	0.71	0.71
Br	Cl	0.36	-2.10	0.46	0.94	0.94
NMe ₂	Cl	0.21	-2.64 ^{f)}	-0.60	0.64	0.64
NO ₂	OMe	-0.90	-2.05	0.51	0.97	0.97
OMe	Cl	-0.05	-1.38	-0.04	0.77	0.77
Br	F	-0.01	-1.44	0.29	1.01	1.01
NO ₂	NO ₂	-0.89	-3.30	1.56	1.34	1.34
NO ₂	Br	-0.36	-2.77	1.01	1.14	1.14
F	H	-0.05	-0.32	0.06	0.54	0.06
Cl	H	0.00	-0.98	0.23	0.47	0.23
Br	H	0.13	-1.12	0.23	0.47	0.23
I	H	0.29	-1.44	0.18	0.40	0.18
NO ₂	H	-0.76	-1.65	0.78	0.67	0.78
Me	H	0.12	-1.16	-0.17	-0.01	-0.17
NMe ₂	H	-0.02	-1.66 ^{f)}	-0.83	0.17	-0.83
Et	H	0.53	-1.33	-0.15	-0.01	-0.15
OMe	H	0.11	-0.40	-0.27	0.30	-0.27
OEt	H	0.50	-0.55	-0.24	0.28	-0.24
CF ₃	H	0.04	-2.46	0.54	0.40	0.54
CN	H	-0.64	-0.56	0.66	0.57	0.66
SMe	H	0.07	-1.14	0.00	0.30	0.00
<u>i</u> -Pr	H	0.75	-1.66	-0.15	0.01	-0.15
Ph	H	0.90	-2.19	-0.01	0.12	-0.01

a) Taken from Ref.(97) and (98).

b) Taken from Ref.(100).

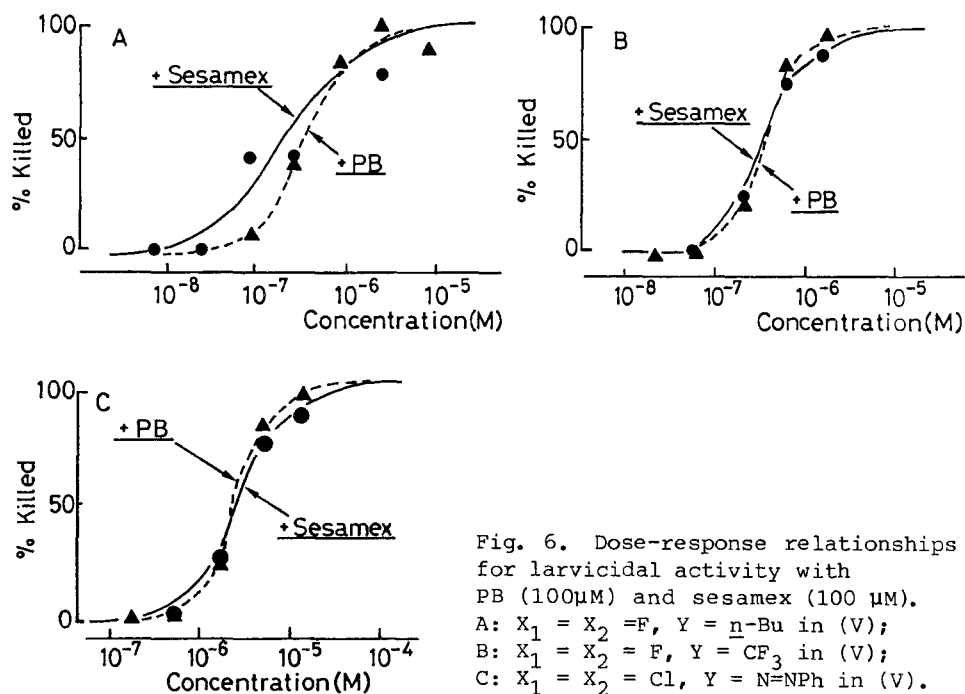
c) Taken from Ref.(86).

d) Taken from Ref.(87).

e) Newly defined electronic parameter which is σ_r for di-ortho-substituted and σ_p for mono-ortho-substituted compounds.

f) The value of i-Pr was used for NMe₂.

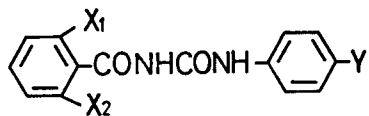
PBより共力効果の強いと考えられている Sesamex^{101,102)} (100 μ M) を用いても、Fig. 6に示すように、3 個の誘導体に関して両共力剤の間でそれほど大きな共力効果の差は認められなかった。



PB(100 μ M)とDEF(100 μ M)を共に含む培地で飼育を行うと、幼虫の成長が顕著に抑えられたため、両共力剤の併用は避けた。Table 7 に示すように、PBの共力効果はDEFのそれに比べてより多くの誘導体で認められたため、以下の定量的解析においては、PB共存下で求めた殺虫活性(pLD₅₀(PB))を用いた。Table 7 から明らかなように、殺虫活性はパラ位に電子吸引性の置換基が導入され、アルキル鎖が長くなるに従って上昇した。親水性の比較的高い OMe(No.18), OEt(No.19), Ac(No.21), CH₂CN(No.24)で置換されると活性は顕著に低下した。

簡単な置換基をフェニル部にもつ化合物について得られた定量的構造活性相関に基づいてデザインした化合物(27個)、およびハスモンヨトウに対して強力な殺虫活性を示すクロルフルアズロン類縁体(12個)¹⁷⁾のニカメイチュウに対する殺虫活性をPB存在下で求めたところ、Table 8に示すように19個の化合物でジフルベンズロンに匹敵あるいはそれを

Table 7. Larvicidal Activity of Substituted benzoylphenylureas against rice stem borers



Substituents		Larvicidal Activity ^{a)}						mp.(°C)		
		pLC ₅₀ (M)		pLD ₅₀ (mmol/insect)						
No.	Y	None	PB	None	DEF	PB		obsd.	lit.	
						obsd.	calcd.			
							Eq.13			Eq.30
X ₁ = X ₂ = F										
1	F	<4.30(5%)	4.80	<4.60(45%)	<5.08(44%)	5.69	5.71	5.71	203 - 207	207 - 208 ^{c)}
2	Cl	5.53	5.66	6.50	6.58	6.64	6.30	6.58	232 - 233	230 ^{c)} , 239 ^{d)}
3	Br	5.61	6.16	6.51	7.09	6.72	6.41	6.39	239 - 242	247 ^{d)}
4	I	5.54	6.11	6.27	7.10	6.75	6.50	6.07	239 - 241	
5	CF ₃	5.89	6.26	6.70	7.08	6.92	6.52	6.42	246 - 249	245 ^{c)} , 255 ^{d)}
6	NO ₂	<4.78(0%) ^{b)}	<4.78(0%) ^{b)}	<5.08(0%) ^{b)}	5.75	<5.08(0%) ^{b)}	5.96	5.05	268 - 270	260 ^{c)}
7	CN	4.73	4.60	4.90	6.23	5.35	5.56	5.08	228 - 230	
8	H	<4.00(0%)	3.74	<4.60(0%)	<4.60(23%)	4.93	5.06	4.52	194 - 197	191 - 192 ^{c)}
9	Me	<4.00(10%)	<4.00(25%)		<4.60(0%)	<4.60(22%)	5.33	4.90	213 - 214	210 - 211 ^{c)}
10	Et		3.85		<4.60(5%)	4.83	5.63	5.37	187 - 189	185 - 186 ^{c)}
11	<u>n</u> -Pr	<4.00(45%)	4.91		<4.60(33%)	5.86	6.06	5.83	190 - 192	
12	<u>i</u> -Pr	3.48	5.48		<4.60(30%)	6.00	6.09	6.13	193 - 194	196 ^{d)}
13	<u>n</u> -Bu	3.80	5.70	<4.60(45%)	5.06	6.46	6.31	6.20	190 - 194	193 ^{d)}
14	<u>t</u> -Bu	4.11	5.48	5.24	5.55	6.31	6.37	6.11	215 - 217	214 ^{d)}
15	<u>n</u> -Hex	4.23	5.93	5.56	6.04	6.75	6.67	6.81	147	
16	<u>n</u> -Hep			5.27	5.34	6.77	6.80	6.70	146 - 147	
17	N=NPh	5.63	5.51	6.50	7.05	6.49	6.66	6.75	225	
18	OMe	<4.00(0%)	<3.60(0%)		<4.60(5%)	<4.30(10%)	4.73	4.20	219	

19	OEt			<5.08(0%)	<4.60(12%)	5.15	5.19	234
20	OPh	3.65	5.07	<5.08(33%)	5.97	6.54	5.79	205 - 206
21	COMe	<4.30(0%)	<3.30(0%)	<4.60(0%)	<4.30(0%)	4.97	4.39	223 - 229
22	CO-n-Pr	<4.30(0%) ^{b)}	<3.60(5%) ^{b)}	<4.60(0%)	<4.30(0%) ^{b)}	5.87	5.65	206 - 209
23	COPh	<4.78(0%) ^{b)}	<4.78(0%) ^{b)}	5.45	<4.60(0%) ^{b)}	6.03	4.50	203 - 206
24	CH ₂ CN	<4.30(0%)	<4.30(0%)	<4.60(0%)	<4.30(0%)	4.16	3.14	202 - 203
25	SO ₂ NEt ₂	<4.00(10%) ^{b)}	<3.30(0%) ^{b)}	<4.30(5%)	<4.00(5%) ^{b)}	5.73	5.14	186

X₁ = X₂ = Cl

65	F	<4.78(0%)	<4.78(0%)	<5.08(0%)	<5.08(0%)	5.20	5.20	211 - 213	207 ^{c)} , 212 ^{e)}
66	Cl	4.46	4.73	5.60	5.69	5.79	5.67	228 - 232	224 ^{c)} , 236 ^{e)}
67	Br	4.68	5.02	5.68	5.89	5.90	5.42	230	236 ^{e)}
68	I	4.77	5.28	5.82	5.94	5.99	5.67	211 - 214	215 ^{e)}
69	CF ₃	5.22	5.35	6.12	6.41	6.02	5.72	212 - 214	209 ^{c)} , 214 ^{e)}
70	NO ₂	4.40	4.75	5.07	5.27	5.45	5.62	244 - 245	256 ^{e)}
71	CN	<4.00(32%)	4.54	<4.30(47%)	5.28	5.04	5.68	233 - 234	248 ^{e)}
72	H	<3.28(0%)	<4.00(10%)	<4.60(0%)	4.12	4.55	4.85	195	194 ^{c)} , 196 ^{e)}
73	Me	<3.47(0%)	4.13		<4.30(47%)	4.82	5.51	241	227 ^{c)} , 242 ^{e)}
74	Et	<4.00(0%)	4.82		5.30	5.12	5.59	224	223 ^{c)} , 228 ^{e)}
75	n-Pr	<3.00(15%)	4.68		5.89	5.55	5.53	199 - 201	194 ^{e)}
76	i-Pr	<4.00(10%)	4.99		6.12	5.57	6.14	207 - 208	204 ^{e)}
77	n-Bu	<4.00(10%)	5.03		5.42	5.80	5.58	196 - 198	190 ^{e)}
78	t-Bu	4.38	4.80	5.29	5.93	5.86	6.23	214 - 215	212 ^{e)}
79	n-Hex	<4.00(45%)	5.07		5.91	6.16	6.09	157 - 159	
80	N=NPh	4.82	4.96	5.53	5.40 ^{b)}	6.15	5.71	239 - 240	
81	OMe	<3.54(0%)			<4.30(0%)	4.22		193	194 ^{e)}
82	OEt	<4.00(0%)		<4.30(0%)	5.02	4.64	4.97	203	

a) The value in parentheses is persantage killed at the corresponding concentration.

Unless indicated not measured.

b) Striped pattern emerged on the integumental surface at the dose of 8.35×10^{-6} mmol/insect or 1.0×10^{-5} M in agar.

c) Taken from Ref.(20). d) Taken from Ref.(14). e) Taken from Ref.(19).

Table 8. Larvicidal activity against rice stem borers and melting point of designed benzoylphenylureas and chlorfluazuron derivatives



No.	Substituents Y	Larvicidal Activity (pLD ₅₀ (mmol/insect)) ^{a)}				m.p.(° C)
		None	DEF	PB		
				obsd.	calcd. Eq.13	obsd.
26	OCH ₂ Ph	6.49	6.31	6.75	6.45	192 - 193
27	OCH ₂ Ph(2-F)			6.74	6.50	203 - 204
28	OCH ₂ Ph(3-F)			6.59	6.50	188 - 189
29	OCH ₂ Ph(4-Cl)	6.41	6.51	6.53	6.98	205 - 206
30	OCH ₂ Ph(2,4-diCl)			6.87	7.20	195 - 196
31	OCH ₂ Ph(3-CF ₃)			6.72	6.87	190 - 191
32	OCH ₂ Ph(3,4-diMe)			7.01	7.08	194 - 195
33	OCH ₂ Ph(3-NO ₂)		5.38	5.63	5.99	202 - 203
34	OCH ₂ Ph(2-CN)		<5.08(11%)	<5.08(0%)	5.69	228 - 230
35	O(CH ₂) ₂ Ph			6.88	6.18	184 - 185
36	O(CH ₂) ₂ Ph(4-OMe)			6.10	5.92	172 - 173
37	O(CH ₂) ₂ Ph(2-Me)			6.66	6.53	186 - 187
38	O(CH ₂) ₂ Ph(3-Me)			6.69	6.47	183 - 184
39	O(CH ₂) ₂ Ph(4-Me)			6.48	6.39	181 - 182
40	O(CH ₂) ₂ Ph(2-Cl)			6.41	6.61	178 - 180
41	O(CH ₂) ₂ Ph(3-Cl)			6.86	6.54	190 - 191
42	O(CH ₂) ₂ Ph(4-Cl)			6.78	6.42	200 - 201
43	O(CH ₂) ₃ Ph			7.08	6.85	174 - 175
44	O(CH ₂) ₄ Ph			6.70	6.53	163 - 165
45	Ph			6.89	6.60	229 - 232
46	Ph(4-Cl)			7.02	7.09	260 - 261
47	Ph(4-Br)			7.29	7.16	265 - 267
48	SO ₂ Ph		<5.30(11%)	5.55	5.82	213 - 215
49	(E)CH=CHPh			6.78	6.91	232 - 234
50	(Z)CH=CHPh			6.46	6.41	184 - 186
51	n-Oct			6.68	6.79	120 - 121
52	n-Dod			6.41	6.30	135 - 136
53	O-2-Py		4.86	5.31	5.27	169
54	O-2-Py(5-CF ₃)			6.48	6.22	185
55	O-2-Py(5-Cl)			6.05	6.00	157
56	O-2-Py(5-Br)			6.01	6.11	166
57	O-2-Py(5-I)			6.01	6.21	200
58	O-2-Py(3,5-diCl)			6.58	6.57	194
59	O-2-Py(3,5-diBr)			6.52	6.77	187
60	O-2-Py(3-Me,5-Br)			6.58	6.60	187
61	O-2-Py(3-Cl,5-COOEt)		5.58	5.57	6.32	185
62	O-2-Py(3-CF ₃ ,5-Cl)			6.80	6.72	203
63	O-2-Py(3-NO ₂ ,5-CF ₃)		<5.48(0%) ^{b)}	<4.78(0%)	6.02	186
64	O-2-Py(3-Cl,5-CF ₃)			6.88	6.72	190

a) The value in parentheses is the percentage killed at the corresponding dose.

b) Striped pattern was emerged at the corresponding dose.

凌駕する活性を得ることができ、中でも -Ph(4-Br)を置換基としてもつもの(No. 47)はジフルベンズロンに比べて活性が約4.5 倍高いものであった。いくつかの誘導体について DEF の効果について検討したが、共力効果は認められなかった。

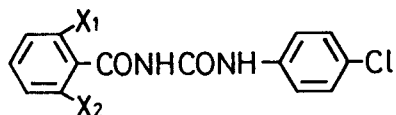
(2) ベンゾイル部

局所投与法を用いて、共力剤の共存下および非共存下で求めた殺虫活性をTable 9 に示した。

フェニル部における場合と同様、PBの効果は電子供与性基で置換されたものに顕著に現れた。一方、DEF の効果は、モノオルトフッ素体に対してのみ顕著で、ジ置換体に対しては全く共力効果が認められなかった。PB共存下で求めた活性は、一般にジ置換体がモノ置換体に比べて高く、2,6-F₂体(No. 2) は最も高い活性を示した。また、無置換体(No. 83)の活性は、たとえPB, DEFのような共力剤を用いても求めることが出来ないほど低いものであった。メタ(3-F) およびパラ置換体(4-F, 4-NO₂, 4-Cl, 4-Br, 4-CH₃)についても殺虫試験を行ったが、活性を示す化合物を見出すことは出来なかった。

片方のオルト位のみにNMe₂(No.105), OMe(No.107), OEt(No.108), CN(No.110)基をもつ誘導体の活性は(16)式から予測される値に比べてかなり低いものであった。OMe, OEt, NMe₂の置換基を片方のオルト位にもつベンズアミドの赤外吸収スペクトルをクロロホルム中で調べたところ、分子内水素結合が観察されたが、通常水素結合性の置換基と考えられているCN基は、この系で水素結合は認められなかった⁹⁸⁾。しかし両方のオルト位が共にこれらの置換基で置換された場合には活性が観察された。これは、これらの化合物においては、側鎖が環と同一平面上に存在できないため分子内水素結合が消失したためと考えられる。クロルフルアズロン類(VII)のベンゾイル部のオルト位に各種置換基をもつ8個の誘導体について、同様に殺虫活性を測定したところ、Table 10に示すように無置換(No. 114)および2,6-(NO₂)₂体(No. 121)ではフェニル部の置換基を塩素に固定したジフルベンズロン類(V:Y = Cl)と同様に活性は得られなかったが、他の置換誘導体ではジフルベンズロン型に比べてそれぞれ3 - 10 倍高い活性を示した。縦軸にクロルフルアズロン類、横軸にジフルベンズロン類の殺虫活性をとってプロットしたところ Fig. 7 に示すような直線関係が得られ、フェニル部の置換基の種類にかかわらずオルト置換基の効果はほとんど変わらないことがわかった。

Table 9. Larvicidal activity against rice stem borers and melting point of ortho-substituted benzoylphenylureas



Substituents No. <div>X₁ X₂</div>			Larvicidal activity (pLD ₅₀ (mmol/insect)) ^{a)}							mp(°C) <div>obsd. lit.^{b)}</div>	
			None	DEF	obsd	PB					
						calcd					
						Eq.16	Eq.17	Eq.30			
83	H	H	<5.60(0%)	<5.60(0%)	<5.60(0%)	6.67	6.08	6.58	252 - 254	248	
2	F	F	6.50	6.58	6.64	6.44	6.24	6.58	232 - 233	230, 239 ^{c)}	
66	Cl	Cl	5.60	5.49	5.69	5.70	5.75	5.67	230 - 232	236 ^{c)} , 224	
84	Br	Br	5.36	5.45	5.36	5.63	5.62	5.34	224 - 226		
85	Me	Me	5.00	5.09	5.20	5.09	5.11	5.35	193 - 194	191 ^{c)}	
86	Cl	F	6.34	6.15	6.29	6.06	6.07	6.21	187 - 189	182 ^{c)}	
87	OMe	OMe	<5.30(11%)	<5.30(6%)	5.79	5.84	5.77	5.32	226 - 228		
88	NO ₂	Me	4.60	4.81	4.69	4.56	4.49	4.75	198		
89	Cl	Me	5.42	5.60	5.82	5.43	5.46	5.97	200 - 202		
90	NO ₂	Cl	4.77	4.76	4.63	4.91	4.89	4.95	221 - 223		
91	NMe ₂	F	<4.78(0%)	<4.78(0%)	5.09	5.50	5.57	5.47	152 - 153	161 ^{c)}	
92	Br	Cl	5.56	5.37	5.76	5.73	5.75	5.84	228 - 229	228 ^{c)}	
93	NMe ₂	Cl	<4.78(0%)	<4.78(5%)	5.33	5.11	5.03	5.04	198 - 200		
94	NO ₂	OMe	5.47	5.36	5.36	5.05	5.18	5.14	214 - 216		
95	OMe	Cl	5.42	5.39	5.88	5.95	5.98	6.25	201 - 203		

96	Br	F	5.96	6.07	6.18	6.04	6.06	6.18	187 - 188	184 ^{c)}
97	NO ₂	NO ₂		<5.30(0%)	<5.30(0%)	4.29	3.98		243 - 246	
98	NO ₂	Br		<5.30(0%)	<5.30(0%)	4.90	4.81	4.74	222 - 224	
99	F	H	<5.30(5%)	5.63	<5.30(0%)	6.43	6.06	5.56	196 - 198	190 - 193
100	Cl	H	5.90	6.27	6.01	6.04	5.98	6.53	201 - 203	200 - 201
101	Br	H	6.31	6.21	6.06	6.01	5.98	5.92	204 - 206	
102	I	H	5.68	5.73	5.44	5.85	5.88	5.56	215 - 216	
103	NO ₂	H	<4.78(47%)	5.04	4.99	5.35	5.47	5.16	208 - 211	
104	Me	H	5.85	5.99	5.88	5.80	5.80	5.99	205 - 207	
105	NMe ₂	H		<5.30(0%)	<5.30(0%)	5.06	5.18		161 - 163	
106	Et	H		<5.60(0%)	<5.60(0%)	5.92	5.92		164 - 165	
107	OMe	H	<5.30(0%)	<5.30(0%)	<5.30(5%)	6.32	5.99		168 - 170	
108	OEt	H		<5.30(0%)	<5.30(0%)	6.44	6.17		140 - 142	
109	CF ₃	H		<5.30(0%)	<5.30(0%)	5.10	5.10		185	
110	CN	H		<5.30(0%)	<5.30(0%)	6.17	5.97		204 - 206	
111	SMe	H		<5.60(0%)	<5.60(0%)	5.86	5.85		210 - 212	
112	i-Pr	H		<5.60(0%)	<5.60(0%)	5.80	5.83		173 - 174	
113	Ph	H		<5.60(0%)	<5.60(0%)	5.56	5.55		162	

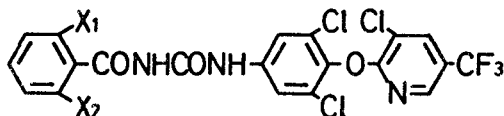
a) The value in parentheses is the percentage killed at the corresponding dose.

Unless noted not determined.

b) Taken from Ref.(20), unless noted.

c) Taken from Ref.(14).

Table 10. Larvicidal activity against rice stem borers and melting point of chlorfluazuron derivatives with various substituents at benzoyl moiety^{a)}



No.	Substituents		Larvicidal Activity		m.p. (°C)
	X ₁	X ₂	pLD ₅₀ (mmol/insect)		
			PB	DEF	
114	H	H	<5.48 (0%)	<5.48 (10%)	244
115	F	H	5.85	6.62	183
116	Cl	H	6.73		140
117	Br	H	6.48		205
118	NO ₂	H	6.05		201
119	F	F	7.13		203
120	OMe	OMe	6.31		218
121	NO ₂	NO ₂		<5.08 (0%)	164

a) The value in parentheses is the percentage killed at the corresponding dose. Unless noted not determined.

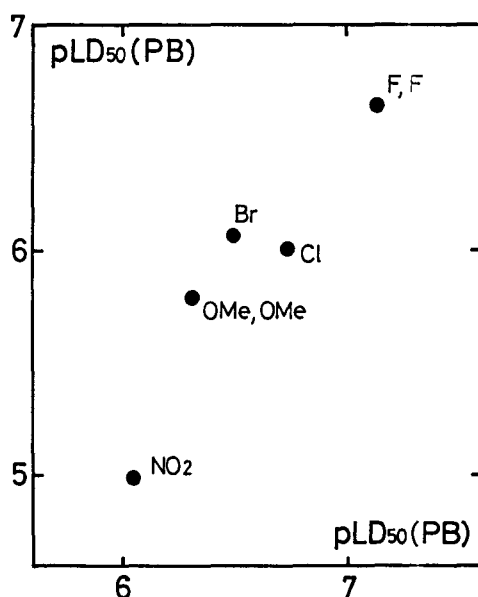
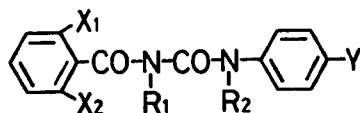


Fig. 7. Relationship of larvicidal activity between chlorfluazuron and diflubenzuron derivatives against rice stem borers. Abscissa: Activity of diflubenzuron derivatives. Ordinate: Activity of chlorfluazuron derivatives.

(3) ウレア架橋部

ベンゾイルフェニルウレア架橋部 (-CONHCONH-) の水素原子を、CH₃ および i-Pr で置換した誘導体の PB 併用下で求めた殺虫活性を Table 11 に示した。また、各々の誘導体の疎水性を表す log k' の値も併記した。

Table 11. Larvicidal activity against rice stem borers and melting point of N-substituted benzoylphenylureas and their hydrophobicity



Substituents					pLD ₅₀ (PB) ^{a)}	mp(°C)	log k' ^{b)}
X ₁	X ₂	R ₁	R ₂	Y			
F	F	H	H	Cl	6.64	230 - 231	-0.080
F	F	H	Me	Cl	5.90	104 - 105	-0.562
F	F	Me	H	Cl	5.90	132	0.099
F	F	Me	Me	Cl	5.15	146	-0.466
F	F	H	i-Pr	Cl		157 - 158	-0.277
F	F	i-Pr	i-Pr	Cl		62 - 63	0.413
F	F	H	H	O(CH ₂) ₃ Ph	7.08	173 - 176	0.325
F	F	H	Me	O(CH ₂) ₃ Ph	5.12	113	0.028
F	F	Me	H	O(CH ₂) ₃ Ph	6.02	103	0.461
F	F	Me	Me	O(CH ₂) ₃ Ph	<4.57(0%)	oil	0.065
OMe	H	H	H	Cl	<4.78(5%)	235 - 236	0.262
OMe	H	H	Me	Cl	<4.60(0%)	157 - 158	-0.437
OMe	H	Me	H	Cl	<4.60(0%)	136 - 142	0.044
OMe	H	Me	Me	Cl	<4.47(0%)	oil	-0.443

a) The value in parentheses is % killed at the corresponding dose.

b) The capacity factor (k') was measured by using CH₃OH/H₂O (4/1) mobile phase.

この結果からも明らかなように、フェニル部を Cl に固定した場合は、CH₃ がどちらの窒素に導入されても、活性は約1/7 に減少し、両方の位置に導入されることによって更に1/7 に低下した。また、O(CH₂)₃Ph でフェニル部のパラ位を固定した誘導体においては、活性の低下率がさらに大きく、ベンゾイル側の-NH-のメチル化によって1/10に、フェニル側のメチル化においては1/100 に減少した。両方の-NH-がメチル化された化合物では、もはや活性は測定することができないほど低いものであった。ベンゾイル部置換基とアミド結合の-NH-との間に分子内水素結合が観察される2-OMe 体についても同様にウレア架橋部をアルキル化し殺虫試験を行ったが、全ての誘導体において活性を求めることはできな

かった。

ウレア架橋部へのアルキル基導入にともなう分子全体の疎水性変化を調べたところ、Table 11に示すようにベンゾイル側に導入された場合は、疎水性は上昇するものの、フェニル側を置換すると疎水性は逆に減少した。両方が置換された場合も、無置換体に比べて疎水性は遥かに低いものであった。2-OMe体のウレア架橋部へのMe基の導入にともなう疎水性の変化は、2,6-F₂体で得られた結果と異なり、どちらの-NH-がメチル化されても疎水性は減少した。

1-3-2 定量的構造活性相関

(1) フェニル部

局所投与法を用いて測定した簡単な置換基をもつ誘導体の殺虫活性 (Table 7) を1-2-4で示した置換基数 (Table 5) を用いて解析したところ、共力剤の存在しない場合、共力剤にPBを用いた場合についてそれぞれ、(9), (10) 式が得られた。共力剤の存在しない場合、活性の測定できなかった化合物の数が多く、化合物の数 n が (9), (10) 式で異なっている。

$$pLD_{50}(\text{None}) = 2.940 \sigma_I - 0.301 \Delta B_s + 2.531 \pi - 0.415 \pi^2 - 0.657 I + 3.220$$

(1.210) (0.337) (0.718) (0.198) (0.287) (0.964) (9)

$$n = 16 \quad s = 0.237 \quad r = 0.943 \quad F = 16.0$$

$$pLD_{50}(\text{PB}) = 0.964 \sigma_I - 0.264 \Delta B_s + 1.373 \pi - 0.137 \pi^2 - 0.465 I + 5.043$$

(0.616) (0.196) (0.466) (0.143) (0.261) (0.415) (10)

$$n = 31 \quad s = 0.348 \quad r = 0.882 \quad F = 17.6$$

(9), (10) 式において、 I はベンゾイル部の両オルト位がフッ素原子で置換された (2,6-F₂ 体) 場合に 0、塩素原子 (2,6-Cl₂ 体) の場合に 1 を与える擬変数である。(9) 式においては ΔB_s 、(10) 式においては π^2 項が統計的に 95% 以上の有意性を示さなかったものの、それぞれ 92.5%、93.8% 以上で有意であり、この原因として π と ΔB_s の間の高い相関性 ((9) 式, $r = 0.939$; (10) 式, $r = 0.883$) が挙げられる。

以上の結果から、殺虫活性はフェニル部の置換基の誘起的電子吸引性 (σ_I) が高く、立体的に横幅 (ΔB_s) の狭いものほど高くなること、2,6-F₂ 体は、対応する 2,6-Cl₂ 体に比べて 3 - 5 倍高くなることがわかった。また、両式において π^2 項がほぼ 94% レベルで

有意であることから、疎水性には最適値の存在することも明らかになった。共力剤を添加することによって電子的効果の寄与は顕著に低下(2.940 → 0.964)する一方、定数項は約1.8上昇し、活性が100倍近く上昇することがわかった。

(9), (10)式では ΔB_s と π との間に相当高い相関性が存在し、両者が真に有意なパラメーターであるかどうかには問題が残るため、 ΔB_s と π の間に相関性のない($r = 0.259$)置換ベンジルオキシ基をもつ誘導体(No. 26 - 34)の活性(Table 8)を調べて解析したところ(11)式が得られ、 ΔB_s および π がともに有意なパラメーターであることが明らかとなった。

$$pLD_{50}(PB) = - 0.485 \Delta B_s + 0.643 \pi + 7.091 \quad (11)$$

(0.234) (0.259) (0.816)

$$n = 8 \quad s = 0.155 \quad r = 0.958 \quad F = 27.6$$

(11)式において電子的効果が有意にならなかったのは、解析に用いた置換ベンジルオキシ基の間で電子的効果に変化が少ないことによる。

ベンゾイル部の2,6-位をフッ素原子で固定したものについて、置換ベンジルオキシ誘導体(9個)(No. 26 - 34)、簡単な置換基について得られた(10)式の結果から高い活性が予測され、予測に基づいて新たに合成した化合物(18個)(No. 35 - 52)、およびクロルフルアズロン類縁体(12個)(No. 53 - 64)を含めて解析したところ、本質的に(10)式および(11)式と変わらない(12)式が得られた。

$$pLD_{50}(PB) = 0.940 \sigma_1 - 0.141 \Delta B_s + 1.235 \pi - 0.133 \pi^2 + 4.974 \quad (12)$$

(0.484) (0.046) (0.234) (0.041) (0.314)

$$n = 53 \quad s = 0.293 \quad r = 0.860 \quad F = 34.2$$

さらに、ベンゾイル部の両オルト位がClで固定されたものも含めて解析すると(13)式が得られた。

$$pLD_{50}(PB) = 0.886 \sigma_1 - 0.136 \Delta B_s + 1.170 \pi - 0.126 \pi^2 - 0.512 I + 5.063 \quad (13)$$

(0.409) (0.046) (0.212) (0.039) (0.207) (0.291)

$$n = 68 \quad s = 0.310 \quad r = 0.889 \quad F = 46.6$$

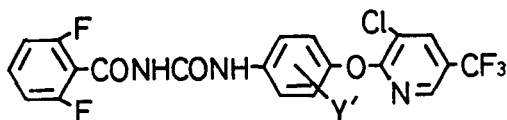
(13)式による計算値と実測値が大きくずれる4個の化合物(No. 10, 35, 61, 80)を除外して解析を行うと、ほとんど解析結果は変わらずにかなり良好な相関関係($s = 0.250$, $r = 0.924$)が得られるが、これらの化合物を特に除く理由がないため、(13)式に含めた。また、(13)式の誘導に用いたパラメーター間の相関性はTable 12に示した。

Table 12. Squared correlation (r^2) matrix for variables used to derive Eq. 13

	π	π^2	ΔB_5	σ_I
π^2	0.819	1.000		
ΔB_5	0.450	0.310	1.000	
σ_I	0.089	0.103	0.004	1.000
I	0.122	0.066	0.183	0.021

クロルフルアズロン類縁体でフェニル部のメタおよびオルト位にも置換基をもつ化合物、およびテフルベンズロン(p, 2)の活性を調べたところ、Table 13に示す結果が得られた。オルト位およびメタ位の置換基の疎水性および電子的効果をパラ位のものに加算して(13)式に代入するとTable 13に示した計算値が得られた。この際、オルト位およびメタ位の置換基の ΔB_5 は考慮しなかった。この結果からも明らかなように、実測値はすべて(13)式から求められる計算値よりもかなり低い値を示した。

Table 13. Larvicidal activity against rice stem borers and substituent parameters for chlorfluazuron derivatives with ortho- and meta-substituents at phenyl moiety



Substituents Y'	Substituent parameters			Larvicidal Activity pLD ₅₀ (PB)(mmol/insect)		m.p.(°C)
	$\Sigma\pi^a)$	$\Sigma\sigma_I^a)$	$\Delta B_5^b)$	obsd.	calcd. Eq.6	
3-Cl	3.37	1.00	6.46	6.73	7.58	187
2-Me	2.74	0.52	6.46	6.46	6.91	145
2,5-diMe	3.20	0.51	6.46	6.54	7.09	185
3,5-diCl	4.37	1.47	6.46	7.13	8.19	203
3-Me,5-COOMe	3.70	1.32	6.46	6.55	7.96	193
Teflubenzuron ^{c)}	2.38	2.02	0.35	7.04	8.88	236

a) Summation of all substituents.

b) For para-substituents.

c) The structure was shown in p. 2.

(2) ベンゾイル部

一般に、オルト置換基は、Esで表される立体効果のほかに、二つの部分からなる電子効果、すなわち通常の電子効果と近接電子効果(誘起的電子効果)を側鎖の官能基にたいして働かせる¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。このことを考慮して以下の解析を行った。

フェニル部における場合と同様、 $pLD_{50}(PB)$ を従属変数として、まず2,6-ジ置換体についてのみ定量的に解析したところ(14)式が得られた。

$$pLD_{50}(PB) = 0.798 \text{ } Es^{\circ}(L) + 0.832 \text{ } Es^{\circ}(S) + 0.501 \pi + 7.181 \quad (14)$$

(0.389) (0.516) (0.413) (0.509)

$n = 15$ $s = 0.265$ $r = 0.910$ $F = 17.5$

(14)式において $Es^{\circ}(L)$ は二つの置換基のうち大きい方の置換基の、 $Es^{\circ}(S)$ は小さい方の置換基の立体効果を表すパラメーターで、オルト置換ベンズアミドの酸加水分解速度を実測して求められた¹⁰⁰⁾。(14)式において、電子吸引性を表すパラメーター $\sigma^{\#}$ (後に述べる)や他の電子的パラメーターは有意とならなかった。この原因として、用いたジオルト体の置換基の電子的効果の大きさに変動が少ないことが考えられる。(14)式において $Es^{\circ}(L)$ 、 $Es^{\circ}(S)$ の係数の大きさが共にほぼ等しいことから、大きな置換基、小さな置換基共に同程度の立体効果を示すことがわかる。したがって、オルトジ置換体の立体効果に対しては両オルト置換基の和 ΣEs° を用いたところ(15)式の結果が得られた。

$$pLD_{50}(PB) = 0.812 \Sigma Es^{\circ} + 0.494 \pi + 7.181 \quad (15)$$

(0.235) (0.363) (0.482)

$n = 15$ $s = 0.254$ $r = 0.909$ $F = 28.7$

(15)式にモノオルト置換体を含めて解析したところ(16)式が得られた。

$$pLD_{50}(PB) = 0.743 \Sigma Es^{\circ} + 0.578 \pi + 0.439 \sigma^{\#} + 6.670 \quad (16)$$

(0.205) (0.335) (0.362) (0.396)

$n = 20$ $s = 0.259$ $r = 0.894$ $F = 21.2$

(16)式において $\sigma^{\#}$ はオルトモノ置換体に対して σ_p 、オルトジ置換体に対しては $\Sigma \sigma_1$ と定義された一組みのパラメータである。すなわち、両方のオルト位が共に置換されたベンズアミド類において、立体構造を検討したところ、側鎖のアミド部はベンゼン間平面に対してほぼ垂直に配置しているが、片方のオルト位のみが置換されたベンズアミドでは、アミド側鎖の同一平面性からの極端なずれは認められなかった。置換ベンゾイルフェニルウレア類も同様の構造をとるため、オルトモノ置換化合物においては、置換基の電子的効果のうち、誘起効果および共鳴効果は共に関与するが、2,6-ジオルト置換体では誘起効果の成分だけが有意になると考えられた。 $\sigma^{\#}$ の代わりに σ あるいは σ_1 を用いても良い相関は得られなかった。オルトモノ置換体を含めた化合物群に関しては、電子効果にかなりの変動が認められたので、(16)式では $\sigma^{\#}$ 項が有意となったと考えられる。(16)式の結果

から、殺虫活性はベンゾイル部の置換基の立体的嵩高さは小さいほど、疎水性は大きいほど、また共鳴効果の立体阻害を考慮した電子吸引性の大きな置換基ほど活性にとって好ましいことがわかった。(16)式の解析に用いた各パラメーター間の相関はTable 14に示した。

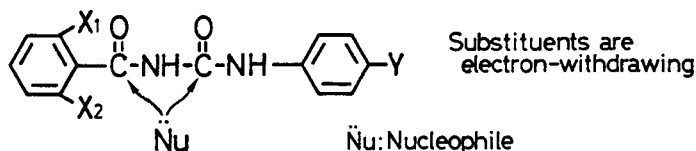
Table 14. Squared correlation (r^2) matrix for variables used to derive Eq. 16

	ΣEs^O	π	$\sigma^{\#}$
π	0.015	1.000	
$\sigma^{\#}$	0.033	0.132	1.000

1-4 考察

フェニル部、ベンゾイル部共に電子供与性置換基を有するものは酸化され易いこと、フェニル部に電子吸引性の強い置換基が導入されたもの、およびベンゾイル部の片方のオルト位にFが導入されたものは加水分解され易いことから、Fig. 8に示すような代謝機構を考えることができる。すなわち、酸化的代謝におよぼす置換基の効果から、電子供与性基はベンゼン環上の電子密度を上昇させることによってベンゼン環から電子を失い易くするものであることが推察される。一般に電子を失う現象は酸化で、この結果と矛盾しないだけでなく、実際に両ベンゼン環が水酸化を受けた代謝物が昆虫^{101, 102, 106-109}および哺乳類¹¹⁰⁻¹¹²)において見出されている。電子吸引性の置換基が活性にとって有効であることは、酸化的代謝に対する化合物の安定性が増すことを示す。PBを用いることによって、電子的効果の寄与が減少したことは、かなりの酸化的代謝が除かれたことを示すものである。

i) Hydrolytic metabolism



ii) Oxidative metabolism

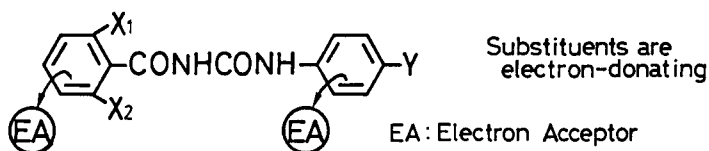


Fig. 8. Effect of substituents of benzoylphenylureas on metabolism mechanisms.

一方、強い電子吸引性基でベンゼン環が置換されると、カルボニル炭素上の電子がベンゼン環の方に引き寄せられて電子密度が減少し、この部分が求核体によって攻撃され易くなって加水分解されると考えられる。酸化代謝物質と同様に、加水分解物も大多数の昆虫^{101, 102, 106, 109, 113-116} および哺乳類¹¹⁰⁻¹¹² において見出されている。比較的電子吸引性の弱い置換基でフェニル部が置換されたものでは、置換基からカルボニル炭素までの距離が長いためにカルボニル基の電子密度の減少はそれほど大きくなく、ハロゲンなどで置換された誘導体に対してはDEFの共力効果がそれほど強く現れなかったと考えられる。

フェニル部に関しては、代謝に対する置換基効果は以上のように酸化的代謝と加水分解で全く逆に働く。このことは、酸化的代謝能の強い昆虫に対しては電子吸引性の、加水分解代謝能の強い昆虫には電子供与性の置換基の有効であることを示すものである。種々の昆虫に対するベンゾイルフェニルウレア類の殺虫活性におよぼすフェニル部置換基の電子的効果の違いについては第2章で述べる。ベンゾイル部のオルト位が置換された誘導体に関しては、オルトモノフッ素誘導体においてのみ顕著なDEFの共力効果が認められ、オルトジ置換体では、たとえ電子吸引性の置換基をもつものに対してもDEFの共力効果は認められず、加水分解代謝は両オルト置換基によって強く立体阻害されるものであることが示唆された。無置換体は、立体的に加水分解代謝を非常に受けやすいと考えられ、今回用いた程度のDEFでは加水分解を抑えるのには充分ではなかったのではないかと推察できる。ニカメイチュウではオルトジ置換体が加水分解に対して比較的安定なものの、オルトジ置換体であるジフルベンズロンの加水分解物は、ある種の昆虫^{101, 102, 106, 109, 113-115}、環境¹¹⁷⁻¹²⁰、土壌微生物¹²¹、哺乳類中¹¹⁰⁻¹¹² において見出されており、このことは、オルトジ置換体が絶対的に加水分解代謝を受け難いのではなく、加水分解代謝能が昆虫の種によって相当異なることを示唆している。たとえば、ハマキガの昆虫においては、ジフルベンズロンおよびトリフルムロンに対してDEFの強い共力効果が観察され、特にジフルベンズロンにおいては3000倍以上も活性の上昇することが知られている¹²²。昆虫間でこのように加水分解能に差の認められたことは、薬剤の選択毒性を考える上で重要な知見であると言える。

Pimprikar と Georgiou の報告によると、抵抗性種の家バエにおいて、ジフルベンズロンの殺虫活性はPBおよびSesamexによって顕著な共力効果を受けるものの、DEFの共力効果は比較的小さいものであった¹⁰¹。また、その抵抗性種のうち、R-diflubenzuron種とR-OMS-12種の家バエ間でSesamexは同程度の共力効果を示したにもかかわらず、PBは

R-diflubenzuron 種に対してのみ強い共力作用を示したことから、代謝は主として酸化代謝を支配するMF0 系に依存するが、両抵抗性種でそのMF0 系の性質の異なることが示唆された。すなわち、家バエにおいて両抵抗性種間でSesamex 感受性のMF0 系はほぼ等しく存在し、PB感受性のMF0 系は R-OMS-12 種にはほとんど存在しないと考えられた。

本研究の結果、ニカメイチュウではPBとSesamex の間でその共力効果にほとんど差の認められないことから、ニカメイチュウでは両MF0 系がほとんど等しく存在しているのではないかと推察される。この事実も、昆虫の代謝分解能および主たる代謝機構が種の間で異なることを示す。ニカメイチュウに対するジフルベンズロンの殺虫活性がPB, Sesamex によって上昇しなかったことから、抵抗性種の家バエやハマキガ科の昆虫に比べるとニカメイチュウの酸化および加水分解代謝能は劣るものではないかと考えられる。しかし、置換基の異なるいくつかの誘導体には代謝されやすいものもあることから、ニカメイチュウを絶対的に代謝機能の低下した昆虫種とみなすことはできない。

定量的構造活性相関解析において、フェニル部・ベンゾイル部共に解析に用いた置換基のパラメーターの種類は若干異なるものの、殺虫活性は疎水的および立体電子的効果によって支配されていることが明らかになった。また、それぞれのパラメーターの意味するところは以下のように考えることができる。

まず、疎水性 (π) に関しては、フェニル部の解析において、 π の2乗項が有意でかつ係数がマイナスであることから、これらは主として化合物の輸送の過程を表していると考えられる(第3章参照)。ベンゾイル部の解析において π の2乗項が有意にならなかったのは、活性の得られた誘導体の置換基の疎水性に最適値を越えるものが存在しなかったことによるものと考えられる。

第2に、立体効果に関しては、フェニル部では ΔB_s で表される幅の狭い置換基であれば比較的長い置換基であっても高い活性の得られることから、フェニル部と相互作用する作用部位の構造は奥行き深い洞窟のようなものではないかと推察される。ピリジルオキシ基のように、相当大きな ΔB_s 値(立体的に不利)を有する置換基がパラ位に導入されても活性の高くなることは、それを相殺してもなお補うだけの大きい疎水性および誘起的電子吸引力をもつためと考えられる。また、ベンゾイル部においては、 Es° で表される置換基の立体的嵩高さの小さい置換基ほど活性にとって好ましいが、立体的嵩高さの小さい置換基をもつ 2-F体や無置換体は加水分解されやすいと考えられるので、加水分解代謝の完全に抑えきられていない条件においては、活性を高めるためにはある程度以上の立体的嵩高

さをもつ置換基がオルト位に導入される必要がある。2,6-F₂体や 2-Cl 体で高い活性が得られたのは、これらの置換基が電子的に好ましいだけでなく、立体的にも最適に近い置換基であることによると思われる。オルト置換基の立体的効果に最適値の存在するかどうかを定量的に検討したところ(17)式が得られた。

$$pLD_{50}(PB) = - 0.202 (\sum Es^{\circ})^2 + 0.494\pi + 0.403\sigma^{\#} + 6.081 \quad (17)$$

(0.064) (0.369) (0.402) (0.325)

n = 20 s = 0.288 r = 0.867 F = 16.1

(17)式は(16)式に比べて相関関係は劣るけれども、(17)式のほうが活性が弱く pLD₅₀(PB) 値の求めることのできなかった無置換体(No.83) および2-CN体(No.110)をより良く予測した(Table 9)。最適値はEs° = 0,すなわち無置換体(No.83) が最も立体的に好ましいことになり、Es° の1次項を用いた結果((16)式)と定性的に変わりはない。

第3に、電子吸引性の置換基は活性の上昇にとって好ましいことから、アミドおよびアニリド結合のアミノ基(-NH-)と作用部位との水素結合が活性発現にとって重要と考えることができる。ウレア架橋部の-NH-アルキル化によって活性は減少するが残存することから、-NH-水素を介しての水素結合は活性の発現にとって重要であるが必須とは考えられない。

本研究の中で、No. 35 - 52 の化合物は(10)式に基づいてデザインしたもので、簡単な置換基について得られた定量的解析は妥当であったことを示すとともに、Ph(4-Br)(No. 47)はジフルベンズロンの4.5 倍高い活性を有し、ベンゾイルフェニルウレアにおける lead optimizationの成功例とも言える。また、合成は行わなかったが、B₅の小さい-C≡CPh 基をもつ誘導体にも、ハスモンヨトウに対して高い殺虫活性の存在することが明らかにされており¹²³⁾、(10)式の定量的解析の正しいことを支持するものである。

Table 13に示すように、クロルフルアズロンやテフルベンズロン(p. 2)のようにフェニル部のパラ位以外の位置に置換基を有するものにも高い活性が見出されているが^{17, 124)}、(10)式にオルトおよびメタの置換基の疎水性と電子吸引性を加算して求められた計算値より実測値は遥かに低い値を示したことから、オルトおよびメタ置換基には立体的効果の関与している可能性がある。

フェニル部をクロルフルアズロンのフェニル部と同様に3,5-dichloro-4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenylに固定し、ベンゾイル部のオルト、メタ、パラ位に各種置換基を導入した誘導体の、ハスモンヨトウに対する殺虫活性の定量的構造活性相関は(18)式で表わせることが報告されている¹⁷⁾。

$$\begin{aligned} \text{pLC}_{50}(S. litura) = & 0.593 + 0.233 \text{ Es}_{\text{ortho}} + 3.15 \text{ Es}_{\text{meta}} \\ & + 2.42 \text{ Es}_{\text{para}} + 0.359 \text{ I} \end{aligned} \quad (18)$$

$$n = 14 \quad s = 0.597 \quad r = 0.931$$

この解析に用いられた化合物数は解析に用いたパラメーター数に比べて少ないこと、すべての係数が95%以上で有意ではないこと、さらに標準偏差が大きすぎることなどの問題点が残されているが、オルト位の置換基の立体的嵩高さは小さい方がよいという点においては我々の結果と部分的に一致している。フェニル部の置換基をClに固定し、ベンゾイル部のメタあるいはパラ位に置換基をもつ誘導体のニカメイチュウに対する殺虫試験を行ったが、活性は測定することができないほど低く、(18)式との定量的な比較はできなかった。しかし、(18)式の結果は、メタおよびパラ置換基のEs項の係数がオルト位のそれに比べて極めて大きく、メタあるいはパラ位に置換基が導入されると立体効果のため活性の極端に低下することを示していて、ニカメイチュウにおける結果と定性的には矛盾しないものである。

疎水性パラメーターとしては $\log P$ の実測値を用いるのが好ましいが、Fig. 4 からわかるようにアルキル、ハロゲンなどのように非水素結合性の置換誘導体に関しては $\log k'$ とほぼ1対1に対応し、水素結合性の置換誘導体においてはその $\log P$ が $\log k'$ から予測される値よりもやや高く見積もられることがわかった。このことから、ピリジルオキシのような水素結合性の置換誘導体においては、その実測値を求めることが望ましいものの、ピリジン環上に非水素結合性の置換基が存在するものに関しては、 $\log P$ と $\log k'$ との間に存在する関係((6)式)を用いて $\log P$ を計算しても差し支えないと考えられる。ピリジン環上に水素結合性の置換基-COOEtを有する誘導体(No. 61)の $\log P$ 値も(4)式から算出したが Fig. 4 の結果からこの値は不適当と考えられ、このことが、(11)式において実測値と計算値の間に大きな差を与える原因になっているのではないかと推察される。No. 10, 35, 80の化合物における実測値と計算値の間の大きなずれの原因については不明である。

ベンゾイル部の2,6-位をフッ素原子で固定した誘導体のウレア架橋部の-NH-をアルキル化することによって疎水性の変化を調べたところ、ベンゾイル側にアルキル基を導入すると疎水性は上昇し、フェニル側では減少することが明らかになったが、このような不規則な疎水性変化は、他に、ベンゾイルフェニルウレア構造の部分構造であるベンズアミドやアセトアニリドにおいても観察されている¹²⁵⁾。すなわち、ベンズアミド($\log P = 0.64$)

の一個の-NH₂水素がメチル基で置換されたN-メチルベンズアミドでは、log P は 0.86 と上昇するが、二個のメチル基が導入されてN,N-ジメチルベンズアミドになると log Pは 0.62に減少する。また、アセトアニリドについても同様にメチル基の導入によって log P が1.16から1.12に減少する。以上のような疎水性変化をもたらす原因については明確なことは言えないが、おそらくアルキル化に伴って水分子との溶媒和と、オクタノール分子との溶媒和の相対的な関係が大きく変化するためではないかと考えられる。ベンゾイル部の片方のオルト位をOMe 基で置換した誘導体のウレア架橋部のベンゾイル側をアルキル化すると、2,6-F₂体とは異なり疎水性が減少した。これは、ウレア架橋部が置換されていない分子ではベンゾイル部の置換基(OMe) と側鎖のアミド-NH-水素との間に分子内水素結合が存在するという赤外吸収スペクトルの結果を支持するものである。すなわち、ベンゾイル側における分子内水素結合の存在する場合には、-NH-水素およびベンゾイル部置換基のOMe 基が水で溶媒和され難いが、水素結合の消失に伴って水との溶媒和が増加するため疎水性が顕著に減少したものである。

第2章 カイコおよびその他の昆虫に対する殺虫活性

2-1 緒言

薬物の殺虫試験は、その本来の目的から害虫を用いて行われることが多いが、昆虫の中にはカイコ (*Bombyx mori*) のような有益昆虫も存在するので、害虫に対してのみ高い殺虫活性を示す選択性の高い化合物を見つけ出すことは重要なことである。カイコの人工飼育法は十分に確立されていて¹²⁶⁾、人工飼料および卵が市販されていることから、本章ではカイコを用いて殺虫試験を行った。この際、薬剤は局所的に投与し、ニカメイチュウの場合と同様に代謝阻害剤の効果についても検討を加えた。また、ベンゾイル部およびフェニル部における置換基効果を各種物理化学的パラメーターを用いて定量的に解析し、ニカメイチュウについて第1章で得られた結果、および他の昆虫に対して得られた定量的構造活性相関の結果と比較した。

2-2 実験方法

100 - 200 粒の卵 (コウベ蚕種 (滋賀県長浜市) から購入) をガーゼに包み、4%ホルマリン溶液に10分間浸漬した後70%のエタノールで更に10分間殺菌する。滅菌済紙の上に殺菌した卵を並べ充分にアルコールを除いた後、済紙のまま人工飼料の上にのせておく。ほとんどの卵が孵化し終わったのち済紙を取り除いて、適宜飼料を交換しながら4令まで飼育する。人工飼料は、市販の稚蚕飼料粉末 (グンゼ株式会社) を2.2 倍量の水で充分練った後、シャーレ (φ18cm) に入れて30分間オートクレーブで滅菌したものをを用いた。4令幼虫の中で、4眠蚕に近い幼虫を10頭ずつ人工飼料を含むシャーレ (直径10cm) に移し、共力剤の効果を検討する場合は、薬剤投与の1時間前にPBあるいはDEFのエタノール溶液 (100mM) を、1 μ l ずつマイクロシリンジにて背板に局所投与した。前章で用いた化合物のうち、簡単な置換基をベンゾイル部およびフェニル部にもつ誘導体を、種々の濃度のジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液として1 μ l ずつ同様に局所投与し、5 - 7 日間無菌飼育したのち致死率を求めた。この際、表皮の成長が薄く体液の滲み出ている幼虫は死んでいるものとみなした。各濃度について20頭の幼虫を用い、各化合物のdose-response-curve から中央致死薬量LD₅₀ (mmol/insect) を求め、活性の指標にはその逆対数値pLD₅₀ をプロビット変換⁸⁵⁾により求めた。定量的解析に用いた置換基パラメーターは前章 (1-2-4) において用いたものと同一である。

Table 15. Larvicidal activity against silkworms of
2,6-difluorobenzoyl-(p-substituted)phenylureas



Substituents Y	Larvicidal Activity (pLD ₅₀ (mmol/insect)) ^{a)}			
	None	DEF	PB	
			obsd.	calcd. Eq. 20
F	5.93	5.78	6.37	6.13
Cl	5.98	5.83	6.12	6.27
Br	6.15	5.86	6.30	6.32
I	5.99	5.72	6.22	6.44
CF ₃	5.90	5.86	6.14	5.96
NO ₂	<4.78(10%)	<4.78(0%)	<4.30(10%)	5.25
CN	4.83	4.79	5.31	5.26
H	5.65	5.45	6.13	6.12
Me	6.19	5.74	6.42	6.44
Et	6.45	6.33	6.62	6.52
<u>n</u> -Pr	6.78	6.86	7.24	6.68
<u>i</u> -Pr	6.70	6.84	6.96	6.73
<u>n</u> -Bu	6.59	6.68	7.06	6.72
<u>t</u> -Bu	6.55	6.70	6.54	6.92
<u>n</u> -Hex	6.44	6.56	6.46	6.59
<u>n</u> -Hep	6.38	6.24	6.71	6.46
OMe	<4.30(0%)	<4.30(0%)	5.54	5.95
OEt	5.64	5.31	6.36	6.18
OPh	6.06	5.49	6.15	6.38
OCH ₂ Ph(4-Cl)	6.08	6.45	6.68	6.99
N=NPh	5.37	5.43	5.83	6.08
SO ₂ NEt ₂	<4.48(0%)	<4.48(10%)	<4.48(0%)	5.21
CO- <u>n</u> -Pr	<4.30(0%)	<4.30(35%)	<4.30(5%)	5.59
COPh	<4.78(0%)	<4.78(0%)	<4.78(0%)	5.61
CH ₂ CN	<4.30(5%)	4.30(50%)	4.30(0%)	5.22

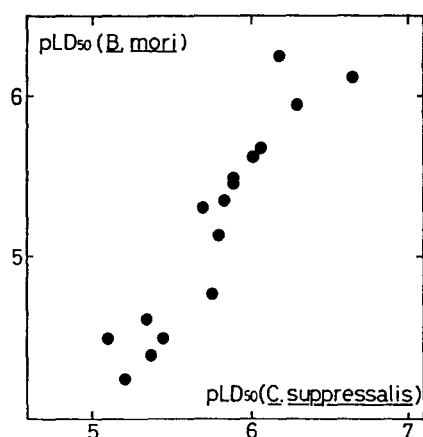
a) The value in parentheses is percentage killed at the corresponding concentration.

2-3 実験結果

2-3-1 殺虫活性と代謝阻害剤の効果

フェニル部の置換基を種々変化させた誘導体のカイコに対する殺虫活性をTable 15に示した。この結果からも明らかなように、これらの誘導体に対しては、PBの共力効果は若干

認められるが、ニカメイチュウにおいて認められたようなDEF による共力効果はほとんど存在しない。また、ハロゲンなどの電子吸引性のものに比べてアルキル、アルコキシなどの電子供与性の置換基をもつ誘導体の活性の高いことがわかった。

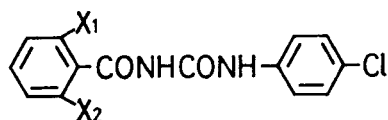


2-3-2 定量的構造活性相關

$$\text{pLD}_{50}(\text{PB}; B. \text{mori}) = 1.437 \text{ pLD}_{50}(\text{PB}; C. \text{suppressalis}) - 3.093 \quad (19)$$

$$(0.315) \quad (1.824)$$

Table 16. Larvicidal activity against silkworms of substituted-benzoyl-4-chlorophenylureas^{a)}



Substituents		pLD ₅₀ (PB)		Substituents		pLD ₅₀ (PB)	
X ₁	X ₂	obsd.	calcd. Eq. 20	X ₁	X ₂	obsd.	calcd. Eq. 20
H	H	<4.78 (0%)		Br	Cl	4.77	5.19
F	F	6.12	6.45	NMe ₂	Cl	4.61	4.57
Cl	Cl	5.31	5.09	NO ₂	OMe	4.39	4.61
Br	Br	<5.00 (0%)	4.61	OMe	Cl	5.45	5.36
Me	Me	4.24	4.38	Br	F	6.25	5.79
Cl	F	5.95	5.95	Cl	H	5.62	5.55
OMe	OMe	5.13	5.23	Br	H	5.68	5.62
NO ₂	Me	<4.00 (0%)	3.65	I	H	4.49	4.73
Cl	Me	5.35	5.27	NO ₂	H	<4.00 (0%)	4.08
NO ₂	Cl	<4.00 (0%)	3.56	Me	H	5.49	5.36
NMe ₂	F	4.49	4.22				

a) The value in parentheses is a percentage killed of larvae in the corresponding dose.

フェニル部における置換基効果を定量的に解析すると(20)式が得られた。

$$\text{pLD}_{50}(\text{PB}) = -1.246\sigma - 0.144\Delta B_5 + 0.755\pi - 0.144\pi^2 + 6.121 \quad (20)$$

$$(0.594) \quad (0.191) \quad (0.413) \quad (0.144) \quad (0.325)$$

$$n = 20 \quad s = 0.294 \quad r = 0.834 \quad F = 8.54$$

(20)式において、 ΔB_5 は統計的に87%以上(T検定)でしか有意でなかったが、これは、Table 17に示すように ΔB_5 の項と π および π^2 項との間にかなりの相関性が存在していることによるものであろう。 σ 、 π 、 π^2 および σ 、 π 、 ΔB_5 の組み合わせにおいても有意な関係が得られたが、(20)式による計算値の方が、活性が正確に求められないほど低かった化合物の活性の予測と矛盾しない。解析に用いた各パラメーター間の相関性はTable 17に示した。

Table 17. Squared correlation (r^2) matrix for variables used to derive Eq. 20

	π	π^2	ΔB_5
π^2	0.860	1.000	
ΔB_5	0.668	0.711	1.000
σ_I	0.121	0.133	0.147

(20)式から、カイコに対しては、フェニル部において電子供与性の置換基の好ましいことが明らかになるとともに、ニカメイチュウの場合と同様に疎水性に最適値の存在することがわかった。立体的効果に関しては、 ΔB_s と π との間にかかなりの相関性があるため明確なことはいえないが、置換基の横幅は小さいほど活性にとって望ましいと言えよう。

2-4 考察

カイコにおいては、フェニル部を種々変化させた多くの置換誘導体に対して PB の共力効果は若干認められたが、ニカメイチュウに対するほどには顕著でなく、また DEF の共力効果はほとんど認められず、4 令後期のカイコでは解毒代謝能力は極めて小さいものと考えることができる。したがって、カイコに対して得られた殺虫活性は、ベンゾイルフェニルウレア類の昆虫に対する本来の活性に近く、フェニル部置換基の電子的効果としては、解毒代謝の効果の無視できる昆虫に対しては、本来供与性である方が望ましいものと考えられる。ニカメイチュウに対する殺虫活性の定量的解析の結果（第 1 章）得られた正の電子吸引効果は、PB で抑えきれなかった酸化的代謝に対する置換基効果を反映しているものと考えることができる。したがって、もしもニカメイチュウにおいて完全に代謝を抑えきることができれば、電子的効果は逆に働く（電子供与性基が好ましい）のではないかと考えられる。ベンゾイル部の置換基効果は、カイコとニカメイチュウの間でほとんど差が無いが、(19)式において $pLD_{50}(PB, Chilo)$ の係数が 1 よりも大きく、両昆虫種間でベンゾイル部オルト置換基の効果に対する感受性に差のあることを示している。

ハスモンヨトウに対する殺虫活性に及ぼすフェニル部パラ位の置換基効果の検討も行われているが、その定量的構造活性相関は (21) 式で与えられる。

$$pLD_{50}(PB) = 1.573 \pi - 0.298 \Delta B_s - 0.046 \Delta L^2 + 5.346 \quad (21)$$

$$(0.337) \quad (0.093) \quad (0.013) \quad (0.387)$$

$$n = 39 \quad s = 0.497 \quad r = 0.850$$

(21)式においては、ニカメイチュウおよびカイコに対する殺虫活性で共に有意にならなかった置換基の結合軸方向の長さ(L)がその2乗項で有意となり、ハスモンヨトウにおける作用点の形状がニカメイチュウやカイコと異なることを示唆している。この結果から、フェニル部の置換基の疎水性が高く、立体的には横幅が狭く、結合軸方向の長さの短いものほどハスモンヨトウに対する殺虫活性にとって好ましいことが分かる。ニカメイチュウに対しては電子吸引性((13)式)の、カイコに対しては電子供与性((20)式)の置換基は

ど活性にとって好ましいことが明らかになったが、ハスモンヨトウの系においては、電子的パラメーターは有意とはならず、酸化的代謝におよぼす置換基の電子的効果 (Fig. 8) から、ハスモンヨトウの酸化代謝能はニカメイチュウより劣り、逆にカイコよりは強いものであることが示唆された。活性発現にとって本来重要な電子供与性効果が、PBの併用によっても完全に抑制されない酸化的代謝を打ち消すために要求される電子吸引性効果とちょうど相殺されたのではないかと考えられる。しかし、(21)式の相関関係は(13)式、(20)式に比べると必ずしも質的に良好とは言えず、再検討の必要がある。

ベンゾイルフェニルウレア類の定量的構造活性相関に関しては、他にも2 - 3 の例があり、Verloop と Ferrell はオオモンシロチョウ幼虫 (*Pieris brassicae*) に対する殺虫活性を定量的に解析して(22)式を導いている²⁷⁾。

$$pED_{50} = 0.84 + 2.35 \sigma - 0.40 L - 0.27 B_4 + 1.10 \pi - 1.40 I - 0.70 I' \quad (22)$$

$$n = 48 \quad s = 0.408 \quad r = 0.909 \quad F = 32.6$$

(22)式において ED_{50} は殺虫活性、 B_4 は置換基の幅を表すSTERIMOLパラメーター (Fig. 5) である。 I は2,6- F_2 体に対して0, 2,6- Cl_2 体に対して1を与える擬変数である。 I' は、N-Me基 (Ⅲ: $R_2=Me$) が存在する場合に1を与える擬変数である。(22)式の結果はニカメイチュウで得られた(9)-(13)式の結果に近いが、この殺虫活性は共力剤を用いずに求められたもので、電子吸引性の寄与が、すなわち σ 項の係数が(13)式の結果に比べて大きいのは、酸化的代謝が抑えられていないためではないかと考えられる。本研究の結果からも明かなように、オオモンシロチョウに対しPBを用いて測定された活性に関しては(22)式の σ 項の係数より小さい値が得られるのではないかと推察される。

Yu と Kuhr は seed corn maggot に対する殺虫活性を PB 存在下で求め (Table 18)、2,6- F_2 , 2,6- Cl_2 誘導体においてそれぞれ(23)・(24)式の結果を得ている²⁰⁾。これらの式に疎水性パラメーター項 π を加えても相関関係に改善は認められなかった。

$$- \log LC_{50} (mM; PB) = 2.512 \sigma - 0.495 \quad (23)$$

$$n = 7 \quad s = 0.534 \quad r = 0.846 \quad F = 5.04$$

$$- \log LC_{50} (mM; PB) = 2.328 \sigma - 0.632 \quad (24)$$

$$n = 7 \quad s = 0.490 \quad r = 0.837 \quad F = 11.69$$

(23), (24) 式に用いられた化合物のフェニル部の置換基はパラ位に限られていないが、パ

Table 18. Insecticidal activity of substituted benzoyl-phenylureas against seed corn maggot larvae^{a)}



Substituents				Insecticidal activity	
Y	σ_I	π	I	pLC ₉₀ (mM)	
				obsd. ^{a)}	calcd. Eq. 25
X ₁ =X ₂ =Cl					
H	0.00	0.00	1.00	2.05	1.62
Me	-0.01	0.37	1.00	1.44	1.88
Et	-0.01	0.82	1.00	2.14	2.23
CF ₃	0.40	1.32	1.00	3.51	3.57
Cl	0.47	0.88	1.00	3.34	3.39
F	0.54	0.19	1.00	3.22	3.02
X ₁ =X ₂ =F					
H	0.00	0.00	0.00	2.27	2.53
Me	-0.01	0.37	0.00	2.77	2.79
Et	-0.01	0.82	0.00	3.49	3.14
CF ₃	0.40	1.32	0.00	4.54	4.48
Cl	0.47	0.88	0.00	4.31	4.30
F	0.54	0.19	0.00	3.89	3.93
NO ₂	0.67	0.45	0.00	4.34	4.44

a) Taken from Ref.(20).

ラ位置換基に限って解析した本研究の結果や、Verloop らの結果とは対応しない。そこで、 σ の代わりにニカメイチュウに対する殺虫活性の解析で用いた σ_I を電子的パラメーターに用いて、パラ置換体に対してのみ再検討したところ(25)式の結果が得られた。

$$pLC_{50}(mM;PB) = 2.332 \sigma_I + 0.772 \pi - 0.912 I + 2.528 \quad (25)$$

$$(0.667) \quad (0.395) \quad (0.405) \quad (0.298)$$

$$n = 13 \quad s = 0.267 \quad r = 0.972 \quad F = 51.4$$

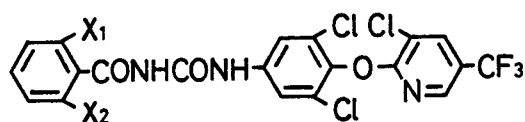
(25)式においてIは2,6-F₂体に対して0、2,6-Cl₂体に対して1を与える擬変数である。(25)式では疎水性項が有意になるとともに相関関係も大きく上昇した。ニカメイチュウにおける場合と同様に、電子的効果としては σ_I の方がはるかに有意なパラメーターであった。また、この昆虫では、たとえ酸化的代謝を抑えてもかなり大きな電子吸引性効果の寄与があることから、ニカメイチュウよりも更に酸化的代謝能の優れた昆虫種ではないかと考えられる。(25)式による計算値はTable 18に示した。

Hajjarと Casida は 2,6-difluorobenzoyl誘導体の milkweed bug (*Oncopeltus*

fasciatus Dallas) に対する殺虫活性の定量的解析を試みたが³¹⁾、 σ 、 π のような置換基定数による検討は加えていない。共力剤を併用して求められた殺虫活性の指標を用いれば、有意な関係を導くことができるかもしれない。

ベンゾイル部におけるオルト置換基効果に関しては、ネッタイシマカ、ハスモンヨトウ、コロラドハムシの間でほとんど差の認められないことが¹⁴⁾、さらにこれらの置換基効果はニカメイチュウおよびカイコに対する殺虫活性に及ぼす置換基効果とほぼ直線的に対応することが認められている。

Table 19. Larvicidal activity of chlorfluazuron derivatives against southern armyworms



Substituents X ₁ X ₂		Larvicidal activity	
		pLC ₉₀ (ppm) ^{a)}	pLC ₉₀ (M) ^{b)}
H	H	0.301	6.00
F	H	1.0	6.72
Cl	H	1.0	6.73
Br	H	0.699	6.46
CH ₃	H	1.0	6.71
NO ₂	H	0.155	5.89
F	F	1.30	7.03
F	Cl	1.0	6.75
OMe	OMe	0.398	6.15

a) Taken from Ref.(17).

b) Calculated from pLC₉₀(ppm).

芳賀らによって求められたハスモンヨトウに対するクロルフルアズロン類縁体の殺虫活性 (Table 19)¹⁷⁾ に対するオルト置換基の効果を、ニカメイチュウに対する殺虫活性におよぼすジフルベンズロン類縁体のオルト置換基の効果 (Table 9)と比較したところ、両者の間に直線関係が認められ (Fig. 10)、カイコの場合と同様に、ベンゾイル部の置換基効果は類似していることがわかった。Fig. 10において、縦軸はハスモンヨトウに対する殺虫活性を示すが、文献で用いられている単位 (ppm) を mole 濃度に計算し直した活性 (pLC₉₀ (M)) 用いた。この図において、○はニカメイチュウに対して DEF の併用下で求めた殺虫活性を用いたものである。Fig. 10 の関係を、Fを除く 5つの化合物について定量的に解析すると (26) 式が得られた。

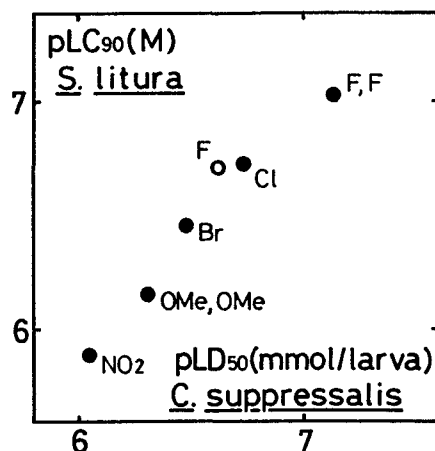


Fig. 10. Relationship of larvicidal activity of chlorfluazuron derivatives with various ortho-substituents at benzoyl moiety between rice stem borers and southern armyworms.

$$pLC_{90}(S. litura) = 1.084 pLD_{50}(C. suppressalis; PB) - 0.639 \quad (26)$$

(0.299) (1.959)

$$n = 5 \quad s = 0.078 \quad r = 0.989 \quad F = 133.1$$

(26)式において係数がほぼ1であることは、ニカメイチュウとハスモンヨトウの間でベンゾイル部オルト置換基の効果に対する感受性に差のないことを示している。ハスモンヨトウではPBを併用しないで求めた活性で、PB併用下で求めたニカメイチュウに対する殺虫活性と必ずしも同一レベルの指標とは言えないが、先に述べたようにハスモンヨトウの酸化的代謝能はニカメイチュウに比べて劣ると考えられること、ニカメイチュウにおいてベンゾイル部の置換基の代謝におよぼす効果にあまり差の無いことから、両者を関係づけても良いであろう。また、この式にはモノオルトフッ素誘導体を含めなかったが、DEF を共力剤に用いて求めたニカメイチュウに対する殺虫活性を従属変数に用いれば、同様な関係が得られる。

以上のように、殺虫活性に及ぼすフェニル部の置換基効果は、昆虫種の違いによって大きく異なることが明らかになった。中でも、電子的効果の違いは大きく、これは酸化的代謝能の差を反映しているもので、一般的な酸化的代謝阻害剤である PB を用いても昆虫によっては酸化的代謝を完全に抑えることができていない可能性がある。ただし、カイコは農薬などの異物の影響を受けることなく、人工的に長期にわたって飼育されてきたことから、解毒代謝能は極めて低下し、PBによってカイコの酸化的代謝はほぼ抑えられたと考え

られる。立体的効果に関しても昆虫種間で若干の差が現れたのは、作用部位の形状が若干異なっているためではないかと考えられる。一方、ベンゾイル部においては、殺虫活性におよぼす置換基効果は昆虫間でほとんど差のないことから、ベンゾイル側における代謝はPBとDEF でほぼ抑えられているか、あるいは昆虫間で抑えられ方は変わらないと推察される。

第3章 ニカメイチュウ表皮培養系における表皮形成阻害活性

3-1 緒言

ベンゾイルフェニルウレア類は現象的には表皮の形成を阻害し、脱皮を不完全にして致死効果をもたらす。安居院は、ニカメイチュウの表皮を切り取り、*in vitro*で培養した培養表皮系に脱皮ホルモンである 20-ハイドロキシエクダイソンを作用させることによって人工的に脱皮を誘導し、新しい表皮を形成させることに成功した^{128, 129)}。西岡らはこの培養表皮系を用い、培養液中に加えた糸状菌のキチン合成酵素阻害剤であるポリオキシシン、およびベンゾイルフェニルウレアの濃度に応じて表皮形成が阻害され、阻害活性が定量的に測定されることを明らかにした¹³⁰⁾。培養表皮の調製に用いるニカメイチュウは、飼育条件を短日によって幼虫のまま休眠させることが可能であり⁸²⁾、比較的長期間にわたって表皮調製用として昆虫材料を保存できることから、すぐれた実験材料である。

本章では、このニカメイチュウの培養表皮系を用いて各種置換ベンゾイルフェニルウレアの表皮形成阻害活性を測定し、代謝阻害剤の効果についても検討を加えるとともに、表皮形成阻害活性におよぼす置換基効果、および表皮形成阻害活性と殺虫活性との関係を定量的に解析し、殺虫活性発現の機構について考察を加えたものである。

3-2 実験方法

3-2-1 表皮形成阻害活性の測定¹³¹⁾

1-2-1 に示した方法に従って、日照条件のみを短日(8時間照明)にして休眠幼虫を得た。孵化後 50 - 100 日程度経過した休眠幼虫をパラフィnbロック上に虫ピンで固定し、腹部背板を解剖液(Ringer Tyrode solution)(Table 20)¹³²⁾中で体節ごとに切り取った。

Table 20. Ringer tyrode solution (g/1000 ml)

NaCl	7.0 g	NaH ₂ PO ₄	0.2
KCl	0.2	NaHCO ₃	0.12
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.2	Glucose	8.0
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.1		

次に、得られた表皮切片をRinger液を入れた小さなガラスシャーレ(直径3.5cm)に2頭分ずつ移した。1化合物の活性測定につき24 - 36頭の幼虫を用い、昆虫個体間の差がなくなるように各切片をできるだけ均等に分配した。培養は、滅菌済のプラスチック製容器

($\phi=1.5\text{cm}$ 、 $h=1.0\text{cm}$ Linbro Disposotrays 製) 内で昆虫用組織培養液であるグレース培地¹³³⁾を用いて行った。グレース培地は、各種アミノ酸、ビタミン等から調製したが、ペニシリンなどの抗生物質は加えなかった。まず脱皮を誘導するために、脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdysone ($1\mu\text{g/ml}$) を含む培地で24時間培養し、更に3日間ホルモンを含まず薬剤、あるいは薬剤と共力剤を共に含む培地で培養した。培養後、培養液を取り除いて、倒立顕微鏡でFig. 11 に示すようにして新しく形成される表皮の厚さを測定した。

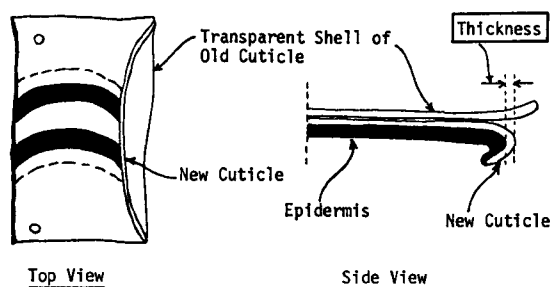


Fig. 11. Measurement of thickness of new cuticle formed on the cultured integument.

3-2-2 化合物

ベンゾイル部の両オルト位を F および Cl で置換し、フェニル部にハロゲン、アルキル、アルコキシ等の比較的簡単な置換基をもつ 52 個の誘導体 (Table 21)、およびフェニル部のパラ位を Cl で固定しベンゾイル部のオルト位に各種置換基をもつ 33 個の誘導体 (Table 22) を用いた。脱皮ホルモンは、ロート製薬から購入した 20-hydroxyecdysone の結晶をエタノール溶液 ($200\mu\text{g/ml}$) として用いた。解析に用いた各種の置換基定数は 1-2-4 に示した。

3-3 実験結果

3-3-1 表皮形成阻害活性と代謝阻害剤の効果

ジフルベンズロンに関して、横軸に濃度、縦軸に各濃度における表皮の厚さをとって方対数プロットすると、Fig. 12 に示すような dose-response-curve が得られた。この曲線をプロビット変換⁸⁵⁾して、コントロールに対し表皮の形成を 50% 抑制する培地中での濃度 $I_{50}(M)$ を求め、活性の指標にはその逆対数 pI_{50} を用いた。電子供与性基で置換された誘導体の中で、共力剤を併用しない場合、正確な pI_{50} 値を得ることのできない化合物が多く存在したため、たとえば、 $n\text{-Bu}$ 基をフェニル部に有する誘導体について PB の効果を調

べたところ、Fig. 13 に示すように I_{50} 濃度は減少し、活性は上昇することが明らかになった。

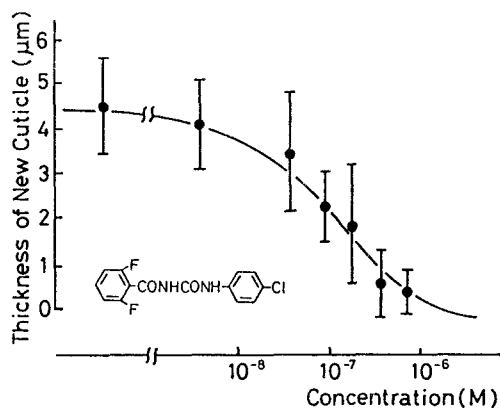


Fig. 12. Dose-response relationships for inhibition of the new cuticle growth by diflubenzuron.

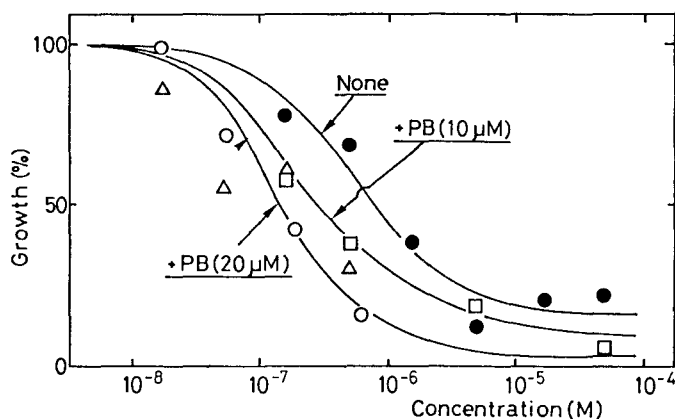


Fig. 13. Synergistic effect of PB on the inhibition of new cuticle growth by benzoylphenylurea (V ; $X_1=X_2=F$, $Y=n-Bu$)
 □ with PB(10 μ M), ○ with PB(20 μ M), △ with PB(50 μ M),
 ● without PB.

このように、組織レベルにおいても酸化的解毒代謝の行われることから、*in vitro*の系における表皮形成阻害活性の測定においても酸化的代謝阻害剤PBを20 μ M の濃度で用いた。一方、加水分解代謝阻害剤DEF の効果は、酸化的代謝阻害剤PBと同じ濃度においてほとんど認められなかった。

Table 21. Inhibition of new cuticle growth of benzoyl-
(para-substituted phenyl)urea^{a)}



Substituents		Inhibition of new cuticle growth $PI_{50}(M)$			
		None		PB	
No.	Y	Obsd.	Calcd. Eq.18	Obsd.	Calcd. Eq.19
$X_1 = X_2 = F$					
1	F	6.95	6.95	7.74	7.27
2	Cl	7.06	7.21	7.95	7.32
3	Br	7.85	7.29	7.61	7.33
4	I	7.29	7.21	7.08	7.30
5	CF ₃	7.11	7.16	7.39	7.26
6	NO ₂	6.60	7.20	6.70	7.24
7	CN ²	6.92	6.84	7.20	7.22
8	H	4.65	5.43	6.66	6.99
9	Me	5.54	5.42	6.62	6.91
10	Et	6.04	5.47	6.66	6.84
11	n-Pr	5.39	5.82	6.72	6.91
12	i-Pr	6.28	5.93	7.09	6.96
13	n-Bu	6.00	5.96	6.80	6.87
14	i-Bu	6.88	6.20	6.80	7.03
15	n-Hex	6.80	6.33	7.14	6.86
16	n-Hep	6.25	6.60	7.00	6.90
17	N=NPh	6.86	6.87	7.36	7.07
18	OMe	4.97	5.42	6.66	6.79
19	OEt	5.25	5.62	7.23 ^{b)}	6.82
20	OPh	<5.30 (23%)	6.73	6.30 ^{b)}	6.90
21	COCH ₃	5.83	5.57	6.60	6.82
22	CO-n ² Pr	6.04 ^{b)}	6.09	6.88 ^{b)}	6.85
23	COPh	5.40 ^{b)}	6.00	5.20 ^{b)}	6.72
24	CH ₂ CN	5.30	4.62	5.89	6.52
25	SO ₂ NEt ₂	6.01	5.96	6.39	6.72
$X_1 = X_2 = Cl$					
65	F	6.15	5.85	6.59	6.67
66	Cl	6.25	6.11	6.50	6.72
67	Br	5.79	6.19	6.13	6.73
68	I	5.47	6.11	6.28	6.70
69	CF ₃	5.28	6.07	6.28	6.66
70	NO ₂	6.50	6.10	6.80	6.64
71	CN ²	6.77	5.75	7.25	6.62
72	H	4.52	4.34	6.40	6.39
73	Me	<5.14 (17%)	4.32	6.75	6.31
74	Et	4.17 ^{b)}	4.38	6.46	6.24
75	n-Pr	5.00 ^{b)}	4.73	6.05	6.31
76	i-Pr	<6.00 ^{b)} (26%)	4.84	6.75	6.36
77	n-Bu	4.70 ^{b)}	4.86	5.88	6.26
78	i-Bu	6.00 ^{b)}	5.11	6.67	6.43
79	n-Hex	6.00 ^{b)}	5.24	6.33 ^{b)}	6.26
80	N=NPh	6.00 ^{b)}	5.78	6.00 ^{b)}	6.47
81	OMe	<4.21 (21%)	4.33		6.18
82	OEt	<4.97 (15%)	4.53	6.38	6.22

a) The value in parentheses is percentage inhibition of new cuticle formation at the corresponding concentration. Unless indicated not determined.

b) Extrapolated from dose-response plots; not included in the analyses (Eq.27 and 28).

Table 22. Inhibition of new cuticle growth by ortho-substituted benzoylphenylureas^{a)}



No.	Substituents		Inhibition of new cuticle growth		No.	Substituents		Inhibition of new cuticle growth	
	X ₁	X ₂	pI ₅₀ (PB)(M)			X ₁	X ₂	pI ₅₀ (PB)(M)	
			obsd.	calcd. Eq. 29				obsd.	calcd. Eq. 29
83	H	H	<6.00(0%)	7.84	98	NO ₂	Br	5.88	6.07
2	F	F	7.95	7.78	99	F	H	6.52	7.60
66	Cl	Cl	6.50	6.64	100	Cl	H	7.55	7.14
84	Br	Br	5.98	6.41	101	Br	H	6.78	7.02
85	Me	Me	6.05	5.93	102	I	H	6.27	6.74
86	Cl	F	7.32	7.21	103	NO ₂	H	6.75	6.83
87	OMe	OMe	7.04	7.44	104	Me	H	6.87	6.82
88	NO ₂	Me	6.07	5.83	105	NMe ₂	H	<6.00(0%)	6.12
89	Cl	Me	6.75	6.29	106	Et	H	<6.00(0%)	6.69
90	NO ₂	Cl	6.27	6.18	107	OMe	H	<6.00(26%)	7.39
91	NMe ₂	F	6.39	6.53	108	OE _t	H	<6.00(0%)	7.28
92	Br	Cl	6.53	6.53	109	CF ₃	H	<6.00(14%)	6.06
93	NMe ₂	Cl	5.75	5.96	110	CN	H	<6.00(0%)	7.66
94	NO ₂	OMe	6.89	6.58	111	SMe	H	<6.00(0%)	6.91
95	OMe	Cl	7.29	7.04	112	<i>i</i> -Pr	H	<6.00(0%)	6.42
96	Br	F	7.18	7.10	113	Ph	H	<6.00(0%)	6.04
97	NO ₂	NO ₂	<6.00(0%)	5.72					

a) The value in parentheses is percentage inhibition of new cuticle formation at the corresponding concentration.

フェニル部およびベンゾイル部の置換基を種々変化させた誘導体の表皮形成阻害活性をそれぞれTable 21、22に示した。

ベンジルオキシ基をフェニル部にもつ化合物に関しては、Fig. 14に示すような dose-response-curveが得られ、溶解度に制限があるため正確な50% 阻害濃度を求めることはできなかった。図のAはベンジルオキシ、Bはバラクロロベンジルオキシ誘導体である。

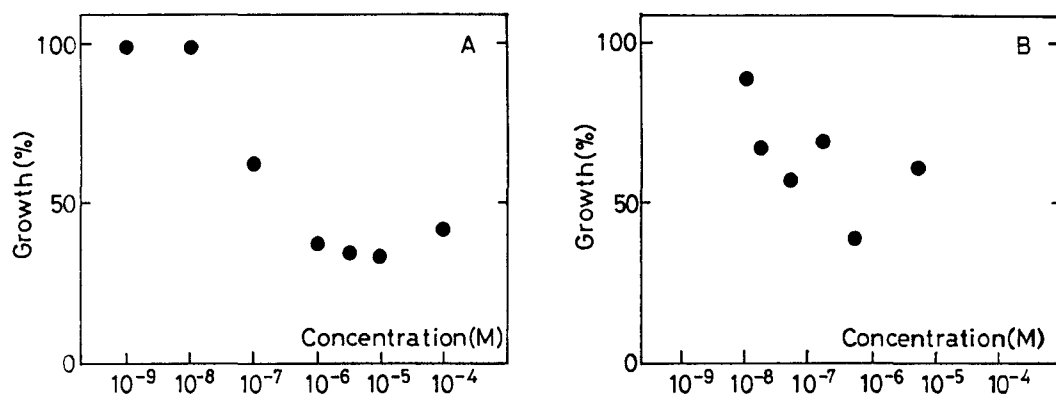


Fig. 14. Irregular dose-response relationships for inhibition of new cuticle formation: A; compound 26 ($X_1 = X_2 = F$, $Y = OCH_2Ph$ in V) B; compound 29 ($X_1 = X_2 = F$, $Y = OCH_2Ph(4-Cl)$ in V).

3-3-2 定量的構造活性相関

(1) フェニル部

Table 21からも明らかなように、殺虫活性の場合と同様、アルキルおよびアルコキシ置換体の表皮形成阻害活性はPBを併用することによって上昇した。共力剤を用いない条件下で求めた活性($pI_{50}(\text{None})$)およびPB存在下で求めた活性($pI_{50}(\text{PB})$)をそれぞれ解析したところ、(27), (28) 式が得られた。

$$pI_{50}(\text{None}) = 2.690 \sigma_1 - 0.289 \Delta B_5 + 0.846 \pi - 1.096 I + 5.433 \quad (27)$$

(0.825) (0.196) (0.311) (0.428) (0.483)

$n = 31$ $s = 0.471$ $r = 0.865$ $F = 19.2$

$$pI_{50}(\text{PB}) = 0.541 \sigma_1 - 0.149 \Delta B_5 + 0.220 \pi - 0.602 I + 6.991 \quad (28)$$

(0.528) (0.126) (0.203) (0.233) (0.321)

$n = 38$ $s = 0.337$ $r = 0.726$ $F = 9.17$

(27), (28) 式の結果から明らかなように、フェニル部の置換基の電子吸引性 (σ_1) および疎水性 (π) が高く、立体的には置換基の最大幅 (ΔB_5) が狭いほど活性の高くなることがわかる。また、 I の係数が負であることからベンゾイル部の置換様式としては2,6- F_2 体が2,6- Cl_2 体に比べて表皮形成阻害活性が約4 - 10倍強いことがわかる。(28)式は(27)式に比べ、また(10)式に比べて相関係数は低い、標準偏差も低い。標準偏差から見ればむしろ相関関係は良好なものと考えられる。すなわち、(28)式における相関係数が(27)式のそれに比べて低いことは、PBを併用することによって活性値の幅が減少したことによる。その結果、電子的・疎水的パラメーターの係数の値が顕著に減少した。(27)式に比べて

(28)式の定数項は約1.5 上昇し、PBを加えることによって全体的に活性が約30倍上昇した。

(2) ベンゾイル部

PB共存下で測定した表皮形成阻害活性(Table 22)を定量的に解析したところ(29)式が得られた。

$$pI_{50}(PB) = 0.816 \sum Es^{\circ} + 0.431 \sigma^{\#} + 7.835 \quad (29)$$

$$(0.207) \quad (0.351) \quad (0.406)$$

$$n = 21 \quad s = 0.281 \quad r = 0.890 \quad F = 34.4$$

(29)式から、ベンゾイル部の置換基の立体的嵩高さが小さく、電子吸引性の大きなほど、表皮形成阻害活性は高くなることがわかる。殺虫活性の解析の結果((16) 式) 有意であった疎水性項は(29)式においては有意とならなかった。

3-3-3 殺虫活性と表皮形成阻害活性との定量的関係

PB存在下で求めた殺虫活性($pLD_{50}(PB)$)と表皮形成阻害活性($pI_{50}(PB)$)との関係はFig. 15 のようになり、両活性の間に直接的な対応は認められなかった。

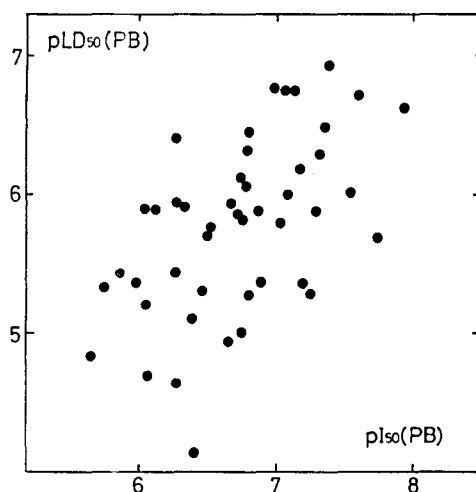


Fig. 15. Relationship between larvicidal activity against rice stem borers and inhibition of new cuticle formation.

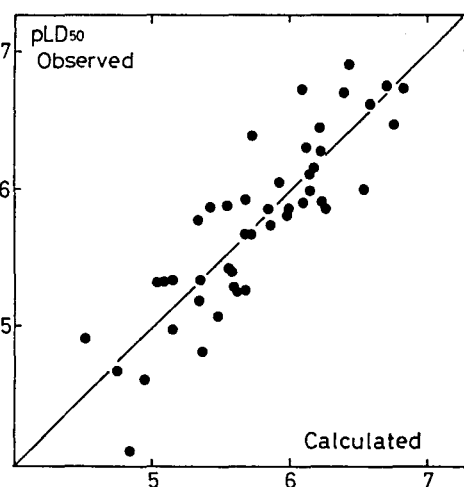


Fig. 16. Relationship expressed mathematically in Eq. 30 between larvicidal activity against rice stem borers and inhibition of new cuticle formation.

しかしながら、分子全体としての疎水性(log P)を考慮することによって、(30)式にあらわされるように両活性は1対1に対応することが明らかになった。この関係を図示するとFig. 16 のようになる。ここで分子全体としての疎水性は無置換ベンゾイルフェニルウレア(Ⅱ: $X_1=X_2=Y=H$)のlog P(3.39)と置換基の π 値(Table 5とTable 6)から計算した。

$$pLD_{50}(PB) = 0.901 pI_{50}(PB) + 2.310 \log P - 0.187 (\log P)^2 - 6.728 \quad (30)$$

(0.202) (1.108) (0.119) (3.143)

$n = 46 \quad s = 0.333 \quad r = 0.864 \quad F = 41.3$

3-4 考察

フェニル部のパラ位にベンジルオキシのような疎水性の高い置換基を有する化合物においては、50%以上の阻害率を与える濃度を正確に求めることはできなかったが、このような現象はクロルフルアズロン誘導体においても認められ、これはビリジルオキシやベンジルオキシなどの非常に疎水性の高い置換基をもつ誘導体の、水に対する溶解度が非常に小さいことによるものと考えられる。たとえば、クロルフルアズロンにおいてその溶解度は $< 0.01 \text{ mg/l}$ (20℃)で、この化合物の活性は pI_{50} が7.73以上でないと求めることができない¹³⁴⁾。また、置換ベンジルオキシ誘導体のdose-response-curve (Fig. 14) から、無置換ベンジルオキシ誘導体(Fig.14, A)は $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (0.038 mg/l)で、パラクロロベンジルオキシ誘導体(Fig. 14, B)は $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ (0.021mg/l)で飽和しているのではないかと推察される。

薬物が生体内を移行する際には、親水性の層と脂質の層を交互に繰り返して透過しなければならないが、その際一連の化合物には最適の疎水性が存在すると考えられるが、(30)式から最適log P 値は6.18であるということになる。この値に最も近いlog Pをもつ化合物はNo. 16(log P=6.35)とNo. 79(log P=6.37)であるが、これを上回る疎水性をもつ化合物に関しては表皮形成阻害活性を求めることはできなかった。また、(30)式で pI_{50} 項の係数がほぼ1であることは、このような疎水性によって支配される薬剤の投与部位から標的部位への輸送過程に対する物理化学的因子を、log P および $(\log P)^2$ 項によってほぼ完全に分離するとき、表皮形成阻害活性と殺虫活性とがほぼ1対1に対応することを示している。(28),(29) 式の結果から明らかなように、標的部位に到達した化合物は作用部位とベンゾイル部では立体電子的な効果により、フェニル部においては、それに加えて若干の疎水相互作用を通じて活性を発現していると考えられる。

Grosscurt と Tipker はイエバエに対する殺虫活性と殺卵活性の関係を定量的に解析し、(31)式の結果を得ている¹³⁵⁾。

- log conc. (larvicidal activity)

$$= 0.22 \text{ days (ovicidal activity after injection)} \\ + 0.62\pi - 0.21 \pi^2 + 0.85 D - 1.32 \quad (31)$$

$$n = 23, \quad s = 0.480, \quad r = 0.847, \quad F = 11.41 \quad (P < 0.0003)$$

(31)式において、Dはベンゾイル部の両オルト位をFで置換したものに対して1それ以外の置換体(2,6-diCl, 2-Cl, 2-Br)に対して0を与える擬変数である。 π はベンゾイル部とフェニル部の置換基の疎水性の和を表している。この結果は、殺卵活性の高いものは殺虫活性が高く、疎水性には最適値の存在することを示し、(30)式の結果と部分的に一致しているが、この場合も殺卵活性の指標として自由エネルギーパラメーターとしては不適当な日(days)を用いていることから、 π およびDが真に有意なパラメーターであるかどうかは疑問の残るところである。(31)式の結果はベンゾイルフェニルウレア類の殺卵活性は胚発生時のクチクル形成阻害によるものであることを示している。

本研究の結果、表皮形成阻害活性の高いものは確かに高い殺虫活性を与えるが、高い殺虫活性を示す化合物がこの表皮培養系で強い表皮形成阻害活性を示すとは限らないことが明らかになった。第1章において示したように、高い殺虫活性は疎水性の高い(最適値は存在する)置換基をフェニル部に導入することによって得られるが、疎水性の大きい化合物は水に対する溶解度が小さく、強い表皮形成阻害活性を示すとは限らない。

第4章 ニカメイチュウ表皮培養系におけるN-アセチル[1-¹⁴C]グルコサミンの取り込みにおよぼす昆虫成育制御物質の効果

4-1 緒言

第3章において、殺虫活性は現象として表皮の形成阻害と密接な関係にあることを、多数のベンゾイルフェニルウレア誘導体を用いて明確にしたが、表皮形成阻害がいかなる機構によって引き起こされるものであるかは不明である。昆虫から調製されたキチン合成酵素を含む無細胞抽出系において、ポリオキシシンは、キチンの前駆体であるUDP-N-acetylglucosamineの重合を阻害するが¹³⁶⁾、ベンゾイルフェニルウレア類にはそのような効果の存在しないことが明らかにされている³⁸⁻⁴²⁾。昆虫以外で、甲殻類もキチンを主成分とする外骨格をもち、脱皮ホルモン(20-ハイドロキシエクダイソン)の作用によって脱皮が誘導され¹³⁷⁾、ある種のエビから調製された酵素系に対しベンゾイルフェニルウレアが阻害効果を示すという報告があるが¹³⁸⁾、何故昆虫と甲殻類とにこのような差があるかについては未解明のままである。本研究では、ニカメイチュウ表皮培養系を用いて、キチンの前駆体であるN-acetylglucosamineの培養表皮への取り込みにおよぼす20-ハイドロキシエクダイソンおよびベンゾイルフェニルウレア類の効果について調べた。さらに、表皮には取り込まれず培養液中にN-acetylglucosamineを取り込んだ高分子が放出されていることが認められたので、その取り込みにおよぼすベンゾイルフェニルウレア類の効果についても調べた。

4-2 実験方法 (Fig. 17)

3-2-1に記載した方法によって調製した6個の表皮切片(1切片の大きさ: ca 1.5×3 mm²)をキチンの前駆体であるN-acetyl-D-[1-¹⁴C]glucosamine(NAG)0.11 - 0.15 nmol/ml (15,000 - 25,000 dpm)を含むグレース培地で培養後、培養表皮と培養液を分離し、培養液を1.2μmのガラスフィルターで濾過した。NAGは市販品(Amersham)を70%エタノールで希釈し、マイクロシリンジにて培養器1つあたり3μlずつ添加した。また、昆虫間の個体差をなくするために、10 - 20頭の昆虫から調製した一頭あたり7 - 8個の表皮切片を各実験系に均等に分配した。培養表皮を0.5 mlの蒸留水で3度洗浄し、その洗液で培養液を濾過したフィルターを洗浄した。培養切片および培養液を濾過したフィルターを液体シンチレーションカウンター(LSC)用バイアル(φ 22 mm)に入れ、第四級ア

シモンニウム塩のトルエン溶液である NCS 0.5 ml を一昼夜室温で作用させた後、シンチレーターであるアクアゾルⅡを 7 ml 加え、LSC (アロカ LSC1000) にて取り込まれた放射能を計測した。各バイアルあたり 3 分間計測し、1 分間あたりの崩壊数 (dpm) をクロロホルムを消光剤として外部標準チャンネル比法¹³⁹⁾によって求めた消光曲線 (クエンチングカーブ) から算出した。また、各実験は 3 連で行い、取り込み量としてはその平均値を用いた。

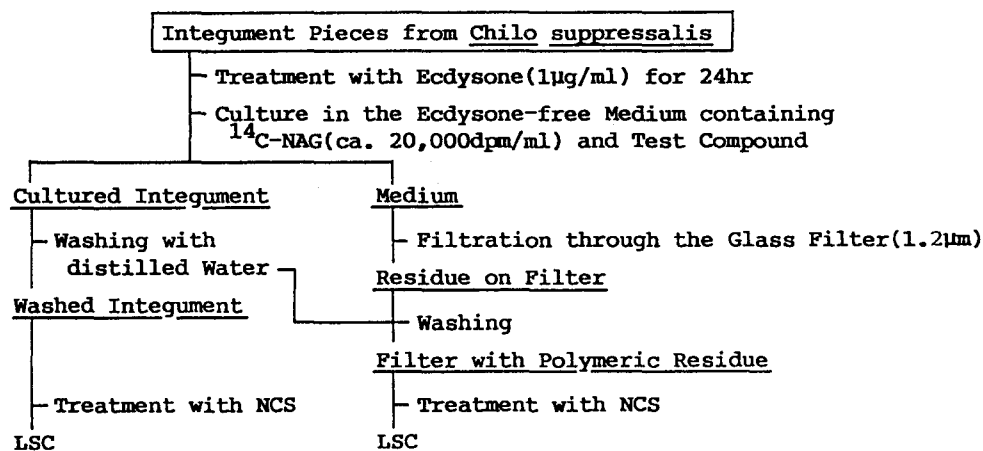


Fig. 17. Experimental methods for the incorporation of NAG in the cultured integument system and the measurement of the incorporated radioactivity.

4-3 実験結果

4-3-1 経時的変化

ニカメイチュウの表皮を、ホルモンを含まず [¹⁴C] でラベルした NAG (19975 ± 1465 dpm) のみを含む培地で培養した後、培養表皮および培養液をグラスフィルターで濾過してフィルター上に捕集される高分子 (以下、培養液中の高分子と呼ぶ) への取り込み量を経時的に調べたところ、Fig. 18 に示すように表皮への取り込みは 48 hr で、高分子への取り込みは 96 hr で定常状態に達した。Fig. 18 および以下の図の中で、各点は 3 連の実験結果の平均値で、その上下幅はそれぞれの標準偏差を表している。一方、20-hydroxyecdysone (1 μg/ml) を含む培地で 24 時間前培養したのち、ラベルした NAG (15594 ± 360 dpm) を含む培地に移して培養した場合、Fig. 19 に示すように表皮への取り込みは時間の経過とともに上昇し、72 時間で定常状態に達し、その量はホルモン処理を施さなかった場合に比べ約 1.5 倍であった。培養液中の高分子に取り込まれる放射能

は 96hr まで徐々に増加した。

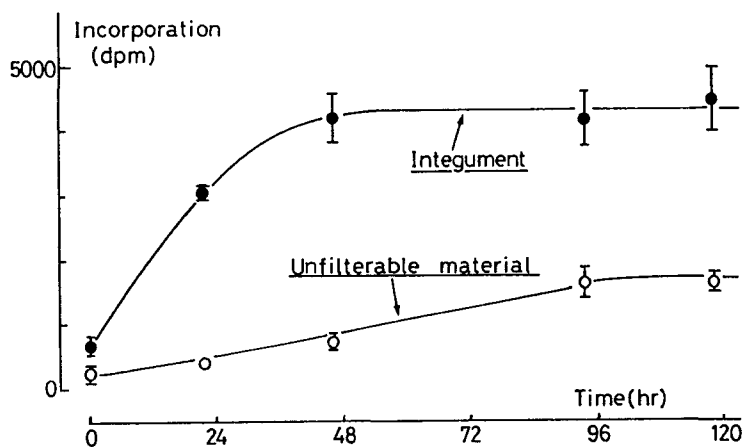


Fig. 18. Time-response relationship for the incorporation of NAG(19975 \pm 1465 dpm) into the cultured integument and unfilterable material in the medium without hormone.

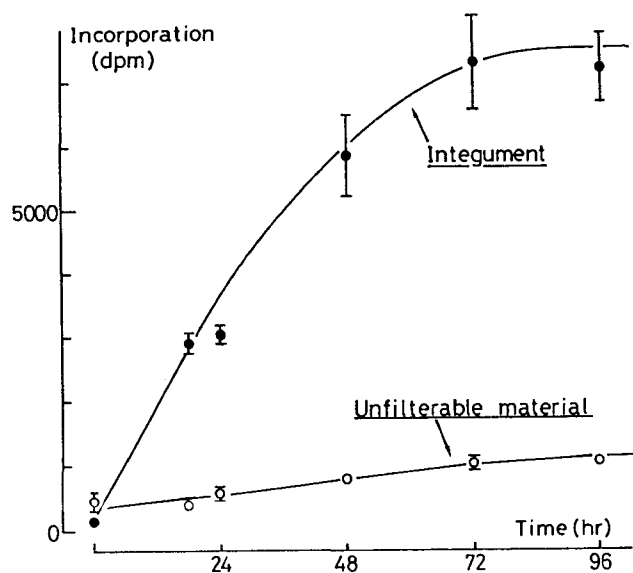


Fig. 19. Time-response relationship for the incorporation of NAG(15594 \pm 360 dpm) into the cultured integument and unfilterable material in medium (Preincubated with 20-hydroxyecdysone (1 μ g/ml) for 24hr).

培養表皮において NAG の取り込みが最も活発に行われる時期を調べるため、ホルモン処理後、0 - 24時間、24 - 48時間、48 - 72時間にラベルされた NAG(17737 \pm 519 dpm) を投与し、それぞれの取り込み量を比較したところ、Table 23に示すように、0 - 24 時間における取り込みは少なく、24 - 48 時間および 48 - 72 時間の間において多く取り込ま

れることが明らかになった。48 - 72 時間の間処理した場合のNAG の取り込み量は0 - 72 時間の間処理し続けた場合とほぼ同程度であった。Table 23および以下の表において、± の後の数値はそれぞれの平均値の標準偏差を表している。

Table 23. Incorporation of NAG in different periods^{a)}

Period of the NAG ^{b)} treatment	Incorporation(dpm)	
	Integument	Polymer
0 - 24 - 48 - 72 hr		
+ + +	6963 ± 234	857 ± 114
+	1879 ± 132	588 ± 59
- +	4758 ± 873	505 ± 23
- - +	6066 ± 406	548 ± 91

a) Data are expressed as the mean ± S.E. of three experiments.

b) In each experiment, integument fragments were precultured in the medium containing 20-hydroxyecdysone (1 µg/ml) for 24 hr before the time 0. The plus sign indicates the "treatment" with NAG(17737 ± 519 dpm). The minus sign indicates the "treatment" without NAG.

4-3-2 表皮培養系におけるN-アセチルグルコサミンの取り込みにおよぼす薬剤の効果

(1) ホルモン処理を施さない表皮培養系

ホルモン処理を施さない培養表皮は48時間で取り込み量がほぼ一定に達する(Fig. 18)ので、NAG を含む培地で48時間培養し、その間の薬剤の効果を調べたところ、Table 24に示すように、培養表皮および培養液中の高分子への取り込みは薬剤によってほとんど阻害されなかった。

Table 24. Inhibition of the incorporation of NAG in the cultured integument system by insect growth regulators under hormone-free conditions.

Compounds ^{a)}	Incorporation(dpm) ^{b)}	
	Integument	Polymer
Control (DMSO)	4847 ± 185	1295 ± 321
Polyoxin D (100 µM)	4830 ± 537 ^{c)}	1219 ± 142 ^{c)}
Diflubenzuron (2 µM)	5342 ± 842	1586 ± 130

a) Cultured for 48 hr in the hormone-free medium with NAG (24154 ± 489 dpm) and test compound.

b) Data are expressed as the mean ± S.E. of three experiments.

c) Data are expressed as the mean ± S.E. of two experiments.

(2) 脱皮ホルモンを作用させた培養表皮系

ホルモン処理を施すことによって新しい表皮が形成されるが、この新しい表皮を剥離して放射活性を調べたところ、多量の放射能（1培養切片あたり2000 dpm）が取り込まれていることがわかり、加えた NAGが実際に新しい表皮の形成に利用されたことが明らかになった。以下の実験においては、新しい表皮を剥離することなく、培養表皮全体をそのまま放射活性の測定に用いた。横軸にホルモンの濃度を、縦軸に各濃度における取り込み量をとってプロットしたところ、Fig. 20 に示すように $1\mu\text{g/ml}$ でほぼ最大の取り込みを示すことがわかった。 $10.0\mu\text{g/ml}$ の濃度においては、取り込み量が低下する。

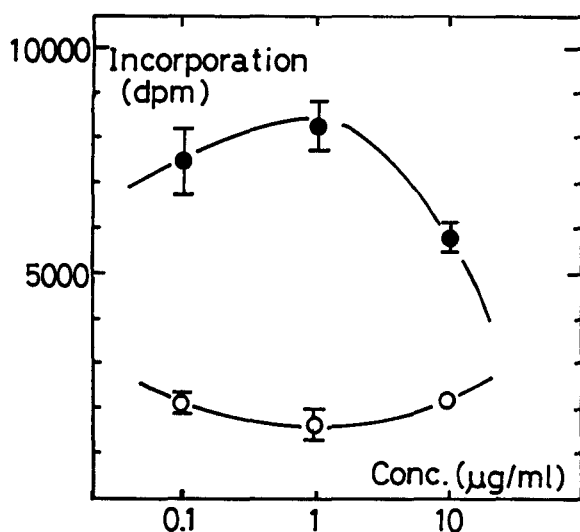


Fig. 20. Dose-response relationship of 20-hydroxyecdysone for the incorporation of NAG(20192 dpm) into the cultured integument and unfilterable material.

また、ホルモンを $1\mu\text{g/ml}$ の濃度において 24 時間以後にも続けて作用させたところ、Table 25に示すように、NAG の表皮への取り込みは顕著に抑えられ、逆に培養液中に放出される高分子への取り込みは増加した。

Fig. 19 においても示したように、ホルモン処理を施すことによって表皮への取り込みは顕著に増大するが、この際、ポリオキシシンDやジフルベンズロンがそれぞれ $100\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$ の濃度で存在しているとその取り込みは抑制される (Table 26)。また、この際に用いた薬剤の濃度において、表皮形成は形態学的にはほぼ完全に抑えられる。

Table 25. Effect of the conditions of treatment with 20-hydroxyecdysone.

Culture conditions	Incorporation (dpm) ^{a)}	
	Integument	Polymer
Hormone-free ^{b)} → Hormone-free ^{c)}	5052 ± 591	2051 ± 687
20-Hydroxyecdysone ^{b)} → Hormone-free ^{c)}	7046 ± 753 ^{d)}	1111 ± 18 ^{d)}
20-Hydroxyecdysone ^{b)} → 20-Hydroxyecdysone ^{c)}	2367 ± 446	1677 ± 128

a) Data are expressed as the mean ± S.E. of three experiments.

b) Cultured for 24 hr.

c) Cultured for 72 hr in the medium containing NAG (18115 ± 276 dpm).

d) Data are expressed as means ± S.E. of two experiments.

Table 26. Effect of insect growth regulators on the incorporation of NAG in the cultured integument system

Culture conditions ^{a)}	Incorporation (dpm) ^{b)}	
	Integument	Polymer
Hormone-free	7819 ± 355	817 ± 247
Polyoxin D (100 μM)	2707 ± 396	1080 ± 74
Diflubenzuron (2 μM)	3475 ± 553	1861 ± 146

a) Integument fragments precultured for 24 hr in the medium containing 20-hydroxyecdysone (1 μg/ml) were transferred to the medium containing NAG (19150 ± 221 dpm) and growth regulators, and cultured further for 72 hr.

b) Data are expressed as the mean ± S.E. of three experiments.

1 μg/mlの濃度の20-hydroxyecdysoneを含む培地で24時間前培養した培養表皮を、ジフルベンズロン、PB(20 μM)、およびNAGのラベル化合物(18561 ± 480 dpm)を含む培地に移して72時間培養した。ジフルベンズロンによる表皮へのNAGの取り込みに対する効果を、取り込み量を縦軸に、横軸に濃度をとって片対数プロットにより検討したところ Fig. 21 に示すような dose-response-curveが得られた。また、ジフルベンズロンについては、その2 μMの濃度において形態学的に表皮の形成がほぼ完全に抑制されるので、その濃度をカバーするdose-response-curveにおける阻害率を100、コントロールを0としてプロビット変換⁸⁵⁾し、コントロールにおける取り込みを50%抑制する濃度を求めたところ、PB共存下において、0.015 μMの値が得られた。この値は表皮形成を50%抑制する濃度0.011 μMにほぼ等しかった。共力剤PBを加えない場合、50%抑制濃度はこれより高く、培養表皮の成長に対するPBの効果と同様の効果が観察された。

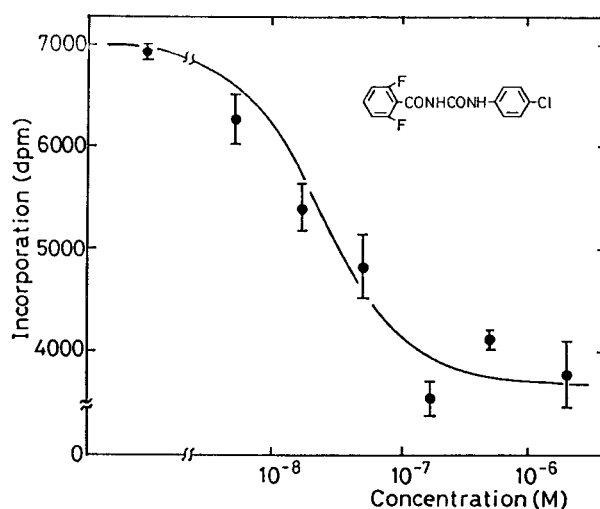


Fig. 21. Dose-response relationship of diflubenzuron for the incorporation of NAG(18561 ± 480 dpm) into the cultured integument preincubated with 20-hydroxyecdysone ($1 \mu\text{g/ml}$).

薬剤の投与時期を変化させ取り込み阻害を調べたところ、ポリオキシシンDおよびジフルベンズロンで Table 27 の結果が得られた。ホルモン処理直後にポリオキシシンD ($100 \mu\text{M}$) によって処理を行うとき、表皮への取り込み阻害が最も大きく現れた。しかし、ホルモン処理を施したのち24時間ホルモンフリー下で培養したものにジフルベンズロン ($2 \mu\text{M}$) で処理 (24-72 hr) しても、ホルモン処理直後から継続して薬剤処理を施した場合 (0-72 hr) とほとんど同程度の取り込み阻害が観察された。

Table 27. Inhibitory effect on the incorporation of NAG by insect growth regulators

Conditions ^{a)}		Incorporation (dpm) ^{b)}	
		Integument	Polymer
Control		6281 ± 1173	951 ± 128
Diflubenzuron ($2 \mu\text{M}$)	0 - 72 hr	4449 ± 415	1760 ± 233
	24 - 72 hr	4238 ± 140	1683 ± 97
	48 - 72 hr	5302 ± 145	1258 ± 208
Polyoxin D ($100 \mu\text{M}$)	0 - 72 hr	3174 ± 369	1468 ± 111
	24 - 72 hr	3851 ± 46	1219 ± 59
	48 - 72 hr	5416 ± 302	1105 ± 242

a) Integument fragments were preincubated for 24 hr in the medium containing 20-hydroxyecdysone ($1 \mu\text{g/ml}$). NAG(15397 ± 163 dpm) was contained in each medium.

b) Data are expressed as the mean \pm S.E. of three experiments.

すなわち、ポリオキシシンDはホルモン処理の直後から継続して投与した場合に最も強い阻害効果を示すが、ジフルベンズロンの阻害効果はホルモン処理後24時間経過してから現れることが示された。また、フィルターに捕集される放射活性は、ジフルベンズロン処理区でポリオキシシン処理のものに比べて若干大きな値を示した。

ポリオキシシンD (100 μ M)とホルモンとを共存させた条件で表皮を24時間処理し、ラベルしたNAG(17478 \pm 1035 dpm)を含むホルモフリーの培地に移して培養を続けた場合、ホルモン単独で処理した後ポリオキシシン処理を行った場合に比べて取り込みの阻害効果が軽減された(Table 28)。ところが、ジフルベンズロンではホルモンとの共存処理の場合と、ホルモン処理後に培地に添加した場合との間に阻害効果にほとんど差は認められなかった(Table 29)。

Table 28. Effect of polyoxin D on the incorporation of NAG in the cultured integument system with simultaneous application of 20-hydroxyecdysone

Culture conditions	Incorporation(dpm) ^{a)}	
	Integuments	Polymer
20-Hydroxyecdysone ^{b)} \rightarrow Hormone-free ^{c)}	7373 \pm 655	1036 \pm 320
20-Hydroxyecdysone ^{b)} \rightarrow Polyoxin D ^{c)} (100 μ M)	2688 \pm 316	1377 \pm 143
20-Hydroxyecdysone ^{b)} \rightarrow Hormone-free ^{c)} + Polyoxin D (100 μ M)	5223 \pm 487	1242 \pm 193

a) Data are expressed as the mean \pm S.E. of three experiments.

b) Cultured for 24 hr.

c) Cultured for 72 hr in the medium containing NAG (17478 \pm 1035 dpm).

Table 29. Effect of diflubenzuron on the incorporation of NAG in the cultured integument system with simultaneous application of 20-hydroxyecdysone

Culture conditions	Incorporation(dpm) ^{a)}	
	Integuments	Polymer
20-Hydroxyecdysone ^{b)} \rightarrow Hormone-free ^{c)}	9930 \pm 102	1457 \pm 40
20-Hydroxyecdysone ^{b)} \rightarrow Diflubenzuron ^{c)} (2 μ M)	3374 \pm 782	2704 \pm 424
20-Hydroxyecdysone ^{b)} \rightarrow Hormone-free ^{c)} + Diflubenzuron(2 μ M)	3140 \pm 914	2616 \pm 480

a) Data are expressed as the mean \pm S.E. of three experiments.

b) Cultured for 24 hr.

c) Cultured for 72 hr in the medium containing NAG (19661 \pm 1152 dpm)

4-2-3 培養表皮系において取り込まれたN-アセチルグルコサミンの形態

ホルモン処理を施した培養表皮およびホルモン処理を施さずに培養した表皮、さらにそれぞれの培養液中に放出され、フィルターに捕集された高分子のキチナーゼに対する安定性を調べた。LSC 用のバイアルにキチナーゼ（シグマ社、EC 3.2.1.14, (C6137)）6 unit/ml を溶かしたリン酸緩衝液 2 ml (pH 6.0) と、培養表皮または培養液を濾過したフィルターを入れて25℃で24 hr 放置した後、酵素液をスポイトで取り除いて、そのままの状態培養表皮およびフィルターをそれぞれ0.5 mlの蒸留水で水洗した後、NCS を一昼夜作用させた。結果はTable 30に示すとおり、ホルモン処理を施した表皮、ホルモン処理を施さなかった表皮、およびそれぞれの培養液中に存在する高分子は、ともにキチナーゼで処理することによって、放射能は顕著に減少した。キチナーゼを含まない緩衝液で25℃、24時間放置した系においても放射能は若干減少し、緩衝液だけでもキチナーゼ処理と同様の効果を示すことがわかった。この詳細は不明であるが、おそらく緩衝液で反応させることによって物理的な吸着が取り除かれたのではないかと考えられる。キチナーゼ処理では緩衝液処理以上の顕著な効果を示す。

Table 30. Stability of the incorporated NAG to chitinase treatment

Preculture conditions ^{a)}	Treatment ^{b)}	Residual counts(dpm) ^{c)}	
		Integument	Polymer
Hormone-free	None	6767 ± 149 ^{d)}	2432 ± 557 ^{d)}
	Phosphate buffer	4717 ± 142 ^{d)}	2474 ± 697 ^{d)}
	Chitinase	2083 ± 395	717 ± 56
20-Hydroxyecdysone (1 µg/ml)	None	10228 ± 953	1278 ± 111
	Phosphate buffer	8457 ± 585	919 ± 32
	Chitinase	2343 ± 117	220 ± 22

a) After preincubation with or without 20-hydroxyecdysone for 24 hr, cultured integument fragments were transferred to the hormone free medium containing NAG (18907 ± 253 dpm).

b) Incubated at 25 °C for 24 hr.

c) Data are expressed as the mean ± S.E. of three experiments.

d) Data are expressed as the mean ± S.E. of two experiments.

アルカリに対する安定性は以下のようにして調べた。すなわち、培養表皮およびその培地を濾過したフィルターをLSC 用バイアルに移して1N-KOH(1 ml)を加えて1 hr 100℃に加熱し、冷却後反応液をスポイトで取り除いた。反応終了後、反応液中にKOH によって分解されなかった高分子が物理的に遊離すると考えられるので、それぞれの反応液を1.2 μ m のグラスフィルターで濾過し、高分子を回収して水洗したのち NCSを一昼夜作用させた。アルカリ処理を行った表皮およびフィルターに残存する放射能と、それぞれの反応液を濾過してフィルターに捕集される高分子に残存した放射能を加え合わせて、もとの表皮および培養液中の高分子のうちKOH によって分解されず残存する放射能とした。Table 31に示すように、ホルモンフリーの条件で継続して培養した場合、取り込まれた NAGはアルカリ処理によって低分子に分解されたが、ホルモン処理を施した表皮はアルカリ処理に対して安定であった。ホルモン処理後ポリオキシシンD、ジフルベンズロンを作用させた培養表皮、およびその表皮の培養に用いた培養液中の高分子のアルカリ処理による低分子への分解は著しかった。

Table 31. Stability of incorporated NAG to KOH treatment

Culture Conditions ^{a)}	Treatment ^{b)}	Residual counts(dpm) ^{c)}	
		Integument	Polymer
Hormone-free ^{d)}	Untreated	5192 \pm 446	2528 \pm 380
	Treated	1981 \pm 277	930 \pm 130
Hormone-free ^{e)}	Untreated	7819 \pm 355	817 \pm 247
	Treated	7329 \pm 314	421 \pm 53
Polyoxin D (100 μ M) ^{e)}	Untreated	2707 \pm 396	1080 \pm 74
	Treated	799 \pm 180	473 \pm 74
Diflubenzuron (2 μ M) ^{e)}	Untreated	3475 \pm 553	1861 \pm 146
	Treated	468 \pm 55	674 \pm 259

a) After preincubation in the medium with or without 20-hydroxyecdysone for 24 hr, cultured integument fragments were transferred to the medium containing NAG (19150 \pm 221 dpm) and cultured for 72 hr.

b) Heated at 100 °C for 1 hr.

c) Data are expressed as the mean \pm S.E. of three experiments.

d) Preincubated in the hormone-free medium for 24 hr.

e) Preincubated in the medium with 20-hydroxyecdysone (1 μ g/ml) for 24 hr.

4-3 考察

ホルモンフリーの条件下で培養した表皮による NAG の取り込みは、ポリオキシシンやベンゾイルフェニルウレア類でほとんど阻害されなかった。したがって、ホルモンフリー下で培養した表皮に取り込まれた NAG はキチンに生合成されていないと考えられ、これらの作用は、個体レベルで得られた結果、すなわち、ポリオキシシンおよびベンゾイルフェニルウレアが脱皮時においてのみ活性を示す事実と一致するものである。一方、培養液中に放出される高分子は、それに取り込まれる放射能がホルモンフリーの条件でホルモン処理系に比べて高く、キチナーゼで低分子に分解されるものの、ポリオキシシンによって NAG の取り込みが阻害されないため、キチン以外的高分子である可能性もある。

ホルモン処理と同時に阻害剤を作用させた後、培養表皮を阻害剤を含まない培地に移すと、ポリオキシシンの場合はホルモン処理後も薬剤処理を継続した系に比べて阻害率が減少したが、ジフルベンズロンではどちらの処理方法においてもほとんど同等の阻害効果を示し、このことはジフルベンズロンの表皮への吸着がポリオキシシンに比べて相当強いことによると考えられる。

ホルモン処理を施した培養表皮においては、ホルモン処理を施さずに培養したものに比べて培養表皮への NAG の取り込み量が顕著に増加し、さらにこの表皮に取り込まれた NAG はキチナーゼで低分子に分解され、アルカリに対して安定であることから、加えた NAG はキチンに生合成されたと考えられる。この際にポリオキシシンやジフルベンズロンが存在するとその培養表皮への取り込みは抑えられる。しかし、広範囲のキチン合成酵素標品に対してジフルベンズロンは阻害効果を示さないことがわかっている。したがって、ポリオキシシンはキチン合成酵素を直接阻害するが、ジフルベンズロンはポリオキシシンとは異なり、ホルモンの関与する表皮成分の生合成経路をキチンシンターゼ以外の作用点で阻害すると考えられる。(このことに関しては後で詳しく述べる。)

ホルモン処理を施した培養表皮への NAG の取り込みは、ホルモンフリーに変えたのち、24 - 72 時間の間に最も多く取り込まれ、形態学的観察によって得られた結果¹³⁰⁾ とほぼ一致した。48 時間で新しい表皮の形成は形態学的に定常状態に達することから、その後に取り込まれる NAG は表皮の硬化に関与している可能性もあり、今後の詳細な検討を待たねばならない。さらに、薬剤の作用時期の検討から、ポリオキシシンは、ホルモンフリーに戻した直後に強い阻害効果を示し、ジフルベンズロンは 24 時間以降(24 - 72 hr)に阻害活性を示す。したがって、ジフルベンズロンはキチンの生合成を阻害するのではなく、時

期的にその後が続いて起こるクチクル形成段階を阻害するものであると考えられる。

双翅目昆虫の唾腺などの特定の組織細胞には、普通の染色体よりも大きい多系染色体といわれるものが存在し、DNA の増殖は細胞分裂を伴わずに起こる。発育時期によって染色体上のある特定の横縞には泡沫状のふくらみが誘導される。これが一般にパフ (puff) と呼ばれているもので、遺伝子の活性化されている状態を示すものであるとされている¹⁴⁰⁾。パフ形成におよぼすホルモンの作用を調べるにあたってキイロショウジョウバエの唾腺がよく用いられるが¹⁴¹⁻¹⁴⁴⁾、この系において、20-hydroxyecdysone 依存のパフにはホルモン投与直後に形成されるパフ (early puff) と数時間経過した後形成されるパフ (late puff) の存在することが知られている (Fig. 22)¹⁴¹⁾。さらに、early puff の形成時には late puff の形成が 20-hydroxyecdysone によって抑えられていて、early puff の形成直後に誘導されたタンパク質が late puff の形成を刺激することもわかっている¹⁴¹⁾。本実験の結果、ニカメイチュウの表皮培養系でジフルベンズロンの作用時期がホルモン処理直後でなく 24 時間経過した後に顕著に現れること、およびホルモンが常に存在すると表皮への NAG の取り込みは阻害され、培養液中に放出される高分子への NAG の取り込みは若干増加するという結果が、ジフルベンズロンで得られた結果と類似することは、ジフルベンズロンが 20-hydroxyecdysone と同様に late puff の形成段階、あるいはその形成によって誘導されてくる酵素系を阻害している可能性を示すものである。また、ポリオキシンはホルモン処理直後に最大の阻害効果を示すことから、キチン合成酵素は early puff 形成直後に誘導されてくると推察される。

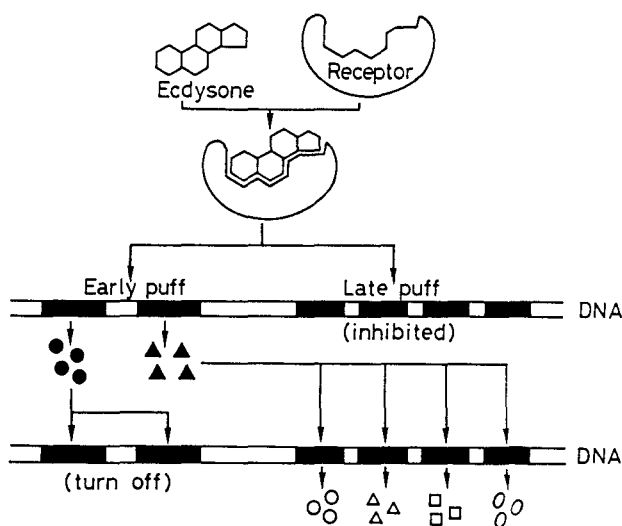


Fig. 22. Mode of action of ecdysone.

ホルモン処理を施した表皮培養系において、培養液中の高分子に取り込まれる NAGの量を調べたところ、ポリオキシンを作用させた条件下ではコントロールとほとんど差がなかったものの、ジフルベンズロンを作用させた系においてはその量は約2倍に増加した。すなわち、コントロールにおいては加えたNAG が表皮の形成に利用されるために培養液中への放出は少なく、ポリオキシンはキチン合成酵素を阻害するためにNAG は低分子のまま培養液中に存在し、フィルターに捕集される量が減少したと考えられる。ところが、ジフルベンズロン処理区においては、培養液中の高分子の量はコントロールやポリオキシ処理区のものに比べて多くなる。したがって、ジフルベンズロンはNAG の高分子化は阻害しないが、クチクル形成を阻害し、高分子が培養液中に放出されるものと考えられる。また、フィルターに捕集された高分子は、キチナーゼによって低分子に分解されるが、アルカリ処理に対しても不安定であるので、培養液中の高分子はキチンであるかどうかは断定できない。ただ、細胞内で生合成されクチクルに組織化されていないNAG のポリマーは、アルカリに対して不安定である可能性は残されている。

以上のことをまとめると、Fig. 23 に示すようなジフルベンズロンの阻害機構が考えられる。ホルモン処理を施さない系においては、ポリオキシシンやジフルベンズロンによるNAG の培養表皮への取り込み阻害効果の認められないので、ポリオキシシンは20-hydroxyecdysoneによって誘導されたキチン生合成酵素を直接阻害してNAG の取り込みを阻害し、ジフルベンズロンはキチン合成酵素を阻害する作用をもたないが、キチン合成以降のプロセス、すなわちクチクルの蓄積段階を阻害するものと考えられる。昆虫のクチクル蓄積に酵素が関与しているかどうかは明確ではないが、ある種の甲殻類においてはポリオキシシンDでは阻害されず、ジフルベンズロンでは阻害される酵素の存在することが明らかにされていて¹³⁸⁾、この酵素がキチンの蓄積に関係しているのかもしれない。

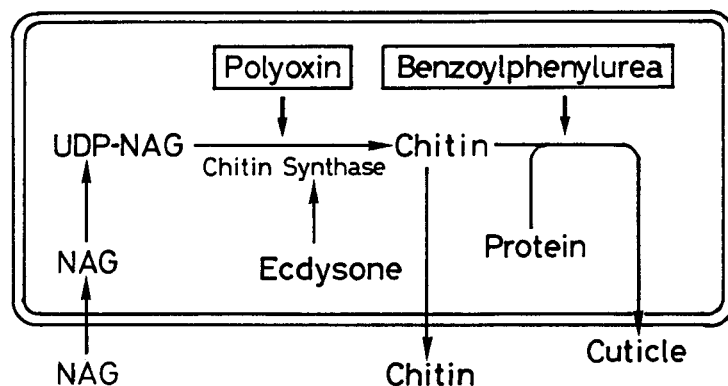


Fig. 23. Possible mode of action of benzoylphenylureas.

脱皮を阻害する殺虫剤として、最近実用化されたベンゾイルフェニルウレア構造を持たないブプロフェジンは、ニカメイチュウのような鱗翅目昆虫に対しては殺虫効果はないが、半翅目昆虫であるウンカに対して強い殺虫活性を有するものである。ブプロフェジンの投与されたウンカは、その数日後に脱皮が不完全となって死に至るが、ブプロフェジン投与後のある時期にエクダイソンを投与すると、致死率の減少することが明らかにされている⁷⁵⁾。また、この化合物は殺虫活性以外に産卵抑止活性をもち、エクダイソンあるいはプロスタグランジンを注射することによって正常な産卵の行われることから^{76), 145)}、エクダイソンによって誘導されたプロスタグランジンが産卵を促進していることが明らかにされた。このようなブプロフェジンの殺虫および産卵抑止活性と、エクダイソンによるその拮抗的作用からブプロフェジンはエクダイソン代謝に作用していると考えられた。ジフルベンズロンとブプロフェジンは構造的にかなり異なることから、これらの作用機構が同一のものであるかどうかは問題であるが、ニカメイチュウ表皮培養系におけるNAGの取り込みにおよぼすジフルベンズロンの阻害実験の結果は、ブプロフェジンで得られた結果と類似し、分子レベルにおいては同じ作用機構もつものであるかもしれない。

第5章 化合物の合成

5-1 ベンゾイルフェニルウレア類の合成

本研究で用いた大部分の置換ベンゾイルフェニルウレア類は以下に述べる方法で合成し、化合物の同定は元素分析、核磁気共鳴スペクトル（NMR）、赤外吸収スペクトル（IR）質量分析スペクトル（MS）、薄層クロマトグラフィー（TLC）に依った。

ベンゾイル部の両オルト位をFで固定し、フェニル部のパラ位に各種置換基を導入する場合は、Fig. 24に示す合成経路に従った。両オルト位をClで固定する場合は、2,6-dichlorobenzamide を出発物質とした。最終生成物の融点はまとめて Table 7 - 10, 13 に示した。置換ベンジルオキシおよび置換ビリジルオキシ基をフェニル部のパラ位に有する誘導体は、それぞれ住友化学および石原産業より恵与を受けた。

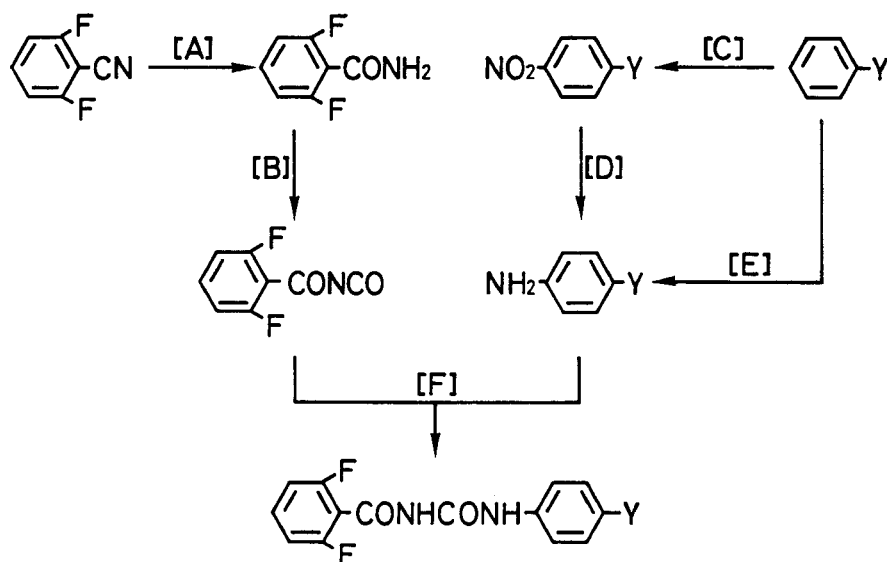


Fig. 24. Synthetic scheme of benzoylphenylureas with various substituents at phenyl moiety.

一方、フェニル部のパラ位をClに固定してベンゾイル部に各種置換基を導入する場合は、Fig. 25に示す経路に従った。

Fig. 24, 25の合成経路に示す各段階（A-N）について、代表的な化合物の合成方法を以下に示した。

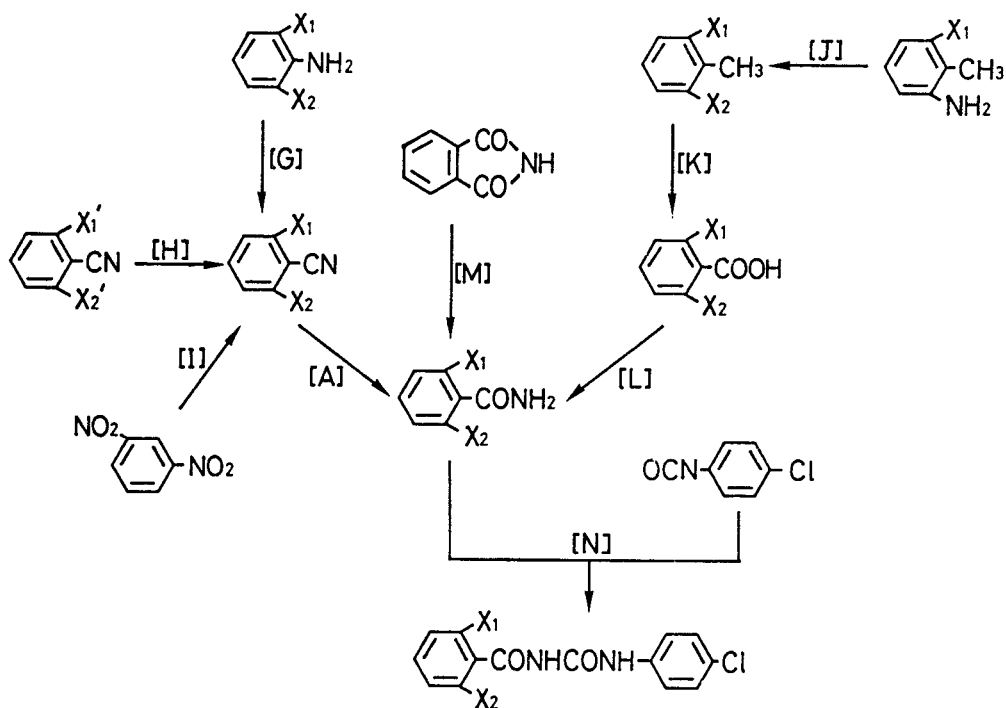


Fig. 25. Synthetic scheme of benzoylphenylureas with various substituents at benzoyl moiety.

[A] 2,6-Difluorobenzamide の合成¹⁴⁾

2,6-Difluorobenzonitrile 5 g (0.036 mol) を 80 % 硫酸 50 ml に加えて 80 °C で約 2 時間攪拌した。反応液を 300 g の水に注ぎ込み、析出した結晶を濾集して、水洗後乾燥した。濾液は水酸化ナトリウムで中和後、トルエンで抽出し濃縮乾固し、先に得られた結晶と合わせた。収量 5.52 g (97.7 %)。

[B] 2,6-Difluorobenzoyl isocyanate の合成¹⁹⁾

充分に乾燥した 2,6-difluorobenzamide 5 g (0.032 mol) を 100 ml の三頸フラスコに入れ、フラスコ内の空気をアルゴンガスで置換した後、アルゴンガス気流下で無水 1,2-ジクロロエタン 50 ml を加えて攪拌しながら、蒸留済のオキサリクロライド約 5 ml (7 g, 0.055 mol) を滴下した。発泡がおさまった後、アルゴンガスの通気を止めて 4 時間還流煮沸した。冷却後、無水条件をできるだけ厳密に保ちながら、減圧蒸留 (56 - 60 °C / 2 mmHg) によって目的物を得た。収量 5.03 g (86.3 %)。

[C]

(i) *p*-*n*-Heptylnitrobenzeneの合成¹⁴⁶⁾

n-Heptylbenzene 10 g (0.057 mol) を 0℃ で濃硫酸 2.7 ml と発煙硝酸 3.2 ml の混合液に滴下した。反応液にベンゼンを加えた後、水で3回洗浄し、ベンゼン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ベンゼンを留去した後、減圧蒸留 (100 - 155 °C/1 mmHg) した。収量 10.4 g。置換基 *n*-heptyl がニトロ化に対してオルト・パラ配向性のため、オルト位およびオルト・パラの両方の位置がニトロ化されたニトロベンゼンも生成するが、ここでは分離せずにそのまま [D] の反応に用いた。

(ii) *p*-Nitrostilbene の合成¹⁴⁷⁾

Benzyl chloride 15 g (0.118 mol) およびトリフェニルホスフィン ($P(C_6H_5)_3$) 31.1 g (0.119 mol) をアセトニトリル (100 ml) 中で4時間加熱還流した。反応液を濃縮後、エーテルを加えて生じた結晶をろ集した (41.5 g; 90.1%)。つづいて、得られた結晶 25.8 g に *p*-nitrobenzaldehyde 10 g (0.066 mol) をアセトニトリル (150 ml) に懸濁し、60℃ に加温して DBN (1,5-diazabicyclo [4,3,0] non-5-ene) 9 g を滴下する。滴下終了後、4時間加熱還流した後、反応液を濃縮し、残渣をベンゼンに溶解し、水洗 (2回) 後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。抽出後濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (WakoGel C-200, 170 g; hexane/benzene = 2/1) で精製し、E体主成分のフラクションをヘキサン-ベンゼン (1/1) から結晶化しE体を得た。収量 3.5 g (23.9%)

残りのフラクションを再クロマト (同条件) して、Z体主成分のフラクションから同じようにしてZ体を結晶化した。収量 3.2 g (21.8%)。

[D]

(i) *p*-*n*-Heptylaniline の合成

[C]-(i) の方法によって合成した *n*-heptylnitrobenzene 10.4 g と華状の Sn (12.3 g) を丸底フラスコに入れ軽く振り混ぜながら、濃塩酸 (25.5 ml) を徐々に加えた。60℃ で時々攪拌しながら約15分、さらに沸騰した湯浴上で30分間放置した。続いて30%の水酸化ナトリウム (14 g/35 ml) を加えた後ベンゼンで抽出した。ベンゼンを留去した後、油状の物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (WakoGel C-200 150 g; benzene) によって精製した (2 g)。置換位置の異なるアニリンが生成するが、TLC (hexane/benzene = 5/1) でニンヒドリン発色するもののうち、最も低い R_f 値を与えるものがパラ置換体であった

(NMR で確認)。n-Octyl, n-dodecylaniline および置換フェニルアニリンも同様の方法によって合成した。

(ii) N,N-Diethylsulfonylaniline

クロルスルホン酸(SO_3HCl) 20 mlを冷却(12 - 15 °C) 振盪しながら充分に乾燥したアセトアニリド10 g (0.07 mol) を少量ずつ加えた。湯浴上で塩化水素ガスの発泡がおさまるまで、時々振盪しながら約2時間還流煮沸した。反応液を氷中(70 g)に注いで結晶を生成させる。生じた沈澱は最初粘ちようであるが、ガラス棒で押し碎いて固化させた後、濾集した。このようにして得た結晶 4.0 gに約2倍モルのジエチルアミンを加えて一昼夜攪拌後、沸騰湯浴上で反応を完結した(収量 4.3 g; 53.8 %)。得られたアミドの結晶を水から再結晶した後、10% の塩酸で20分間煮沸し、アセチル基を除いて目的物を得た。

収量 3.2 g (88.1 %)。

(iii) p-Aminostilbene の合成

p-Nitro-E-stilbene (2.0 g)をメタノール (40 ml) - 水 (10 ml)混合液に懸濁し、還元鉄 (2.7 g)および塩化アンモニウム (2.7 g) を添加し、10時間加熱攪拌した。反応の進行を速めるため、酢酸 2 ml を添加し、さらに2時間加熱攪拌した。反応液を冷却し、セライト上で濾過した。濾液を濃縮後ベンゼンで抽出、水洗 (2回) して無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako-Gel C-200, 50 g, benzene/ethyl acetate=3/1) で精製し、ヘキサン-ベンゼンから結晶化して目的物を得た。収量 1.2 g (69.2 %)。Z体も同様の方法によって合成した。

(iv) p-Phenylsulfonylaniline の合成¹⁴⁸⁾

p-Acetaminobenzenesulfonyl chloride (3 g)および AlCl_3 (ca. 2 g)を無水ベンゼン (20 ml) に加えて 50 °Cで一昼夜攪拌した後、2N-塩酸を含む水の中に注ぎ込んだ。得られた結晶を濾集乾燥しp-phenylsulfonylacetanilide 2.5 g (71.0 %)を得た。つづいて、常法に従って塩酸で脱アセチル化して、目的とするp-phenylsulfonylaniline を得た。

[E]

(i) p-(p-Methylphenethyl)-aniline¹⁴⁹⁾

4-Hydroxy acetanilide 1.00 g (0.0066 mol) を無水2-プロパノール約30 ml に加えて80°Cまで加熱した後、potassium butoxide 0.75 g (0.0066 mol)を加えて15分間還流煮沸した。少し冷却した後、p-methylphenethyl alcohol から合成したp-methylphenethyl

bromide 0.32 g (0.0066 mol) を加えて一晚還流煮沸した。冷却後、1%-水酸化ナトリウム水溶液に反応液を注ぎ込み、結晶をろ集した。収量 0.91 g (51.1 %)。アセトアニリドの脱アセチル化は、1N-塩酸で一晚還流煮沸して行った。

他の置換phenethyloxyaniline, phenylpropyloxyaniline, phenylbutyloxyanilineの合成も同様の方法を用いて行った。

[F] 2,6-Difluorobenzoyl-4-chlorophenylureaの合成^{14, 19)}

無水ベンゼン中で*p*-chloroaniline を攪拌しながら [B] で合成した過剰の2,6-difluorobenzoyl isocyanateを加えた。得られた結晶をろ集してエタノールあるいはアセトニトリルから再結晶した。

[G] 2,6-Dibromobenzonitrile¹⁵⁰⁾

300 ml三頸フラスコに2,6-dibromoaniline 10 g, 水 60 ml, 濃塩酸 27 mlを入れて、モーターで攪拌した。この際、アニリンを溶解させるため一旦 80 °Cまで温度を上昇させ急冷した。次に亜硝酸ナトリウム水溶液(4 g/15 ml) を4 °Cでアニリン塩酸塩溶液に滴下した。反応の終了はヨードカリデンアン紙にて確認し、すばやくろ過してただちに次の反応に利用した。

500 ml丸底フラスコにシアン化第一銅(CuCN) 5.5 gおよび水 50 ml、シアン化カリウム(KCN) 水溶液 (13.5 g/30 ml) を入れて、水冷攪拌しながら前述したジアゾニウム塩溶液を滴下した。40分間水冷後、20分間室温で放置しさらに窒素ガスの発生がおさまるまで加熱した。この溶液を水蒸気蒸留後、エーテルで2回抽出し、2N-塩酸、2N-水酸化ナトリウムおよび水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。エーテルを留去して得られた結晶をエタノール/水から再結晶した。収量 1.15 g (11.1 %)。

[H]

(i) 2-Dimethylamino-6-fluorobenzonitrileの合成

2,6-Difluorobenzonitrile 7.0 g をアセトニトリル 25 g に溶解し、20°C以下に冷却攪拌しながら、乾燥したdimethylamine ガスを1.5 時間吹き込んだ。さらに2時間攪拌した後、溶媒を留去し得られた油状物に250 mlの水を加えて、2N-水酸化ナトリウムでpHを9に調節した。ジクロルメタンで3回抽出し、水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減

圧蒸留して 155 - 157℃/20 mmHgの留分を得た。収量 6.28 g (76 %)。

(ii) 2-Fluoro-6-chlorobenzonitrile の合成¹⁴⁾

2,6-Dichlorobenzonitrile 5.0 g (0.029 mol) を乾燥スルホラン 50 ml に溶解し、細かく粉砕し、十分に乾燥したフッ化カリウム 8.4 g (0.145 mol) を加えた。混合液にベンゼン 25 ml を加え、激しく攪拌しながらシリコンオイル中、180 °C に加熱し、水分をベンゼンと共沸させることによって取り除いた。さらに、激しく攪拌しながら 8 時間還流しつつ 230 - 235 °C に加熱した。茶褐色に変化した反応液を 80℃ まで冷却後、500 ml の水に注いだ後ジクロルメタンで抽出した。抽出液を約 500 ml に減圧濃縮した後、スルホランを除くために水で 7 回洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、分別蒸留によって出発物質および両方共にフッ素原子で置換されたものをできるだけ取り除いて、目的物 2-fluoro-6-chlorobenzonitrile を得た (純度 80.6% GLC)。

[I] (→ [A]) 2-Methoxy-6-nitrobenzamide の合成

常法により 1,3-dinitrobenzene から合成された¹⁵¹⁾ 2-methoxy-6-nitrobenzonitrile 1.0 g をエタノール (40 ml) に溶解し、水酸化ナトリウム 250 mg を加え、65 - 70 °C で加熱攪拌した。30% 過酸化水素水 8 ml を 30 分にわたって徐々に滴下し、さらに 6 時間 65 - 70 °C で加熱攪拌した。反応液を濃硫酸で中和し濃縮後得られた結晶を水から再結晶した。収量 420 mg (38.1 %, m.p. 203 - 204 °C)。

[J] 2-Bromo-6-nitrotoluene の合成¹⁵²⁾

200 ml 三角フラスコに 2-methyl-3-nitroaniline 5 g、水 500 ml、臭化水素 (HBr) 20 ml を入れて氷冷しながら攪拌した。これに亜硝酸ナトリウム水溶液 (4g/15ml) を氷片を加えながら滴下した。ヨードカリデンブン紙にて反応の終点を確認した後、不溶物を綿戸過で取り除いて褐色溶液を得た。500 ml 用丸底フラスコに臭化銅 (CuBr) 5 g、臭化水素 (HBr) 15 ml を加え、上記のジアゾニウム塩溶液を氷冷攪拌しながら滴下した。滴下後 1.5 時間室温で放置し、さらに窒素ガスの発生がおさまるまで加熱した。この溶液を水蒸気蒸留して、トルエンで抽出後、1N-塩酸および水で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。トルエンを留去、乾燥して結晶を得た。収量 4.2 g (59.2 %, m.p. 36 - 39°C)。

[K] 2-Bromo-6-nitrobenzoic acid の合成^{153, 154)}

1000 ml の三頸フラスコに 2-bromo-6-nitrotoluene 4.2 g および水 400 ml を入れてモーターで攪拌しながら過マンガン酸カリ (KMnO_4) 9.8 g を少しずつ加え、110 °C にて 1.5 時間加熱した、反応液を濾過し、更に未反応の過マンガン酸カリを亜硫酸ソーダ (NaHSO_3) で二酸化マンガンを還元し、再度濾過した。濾液に濃塩酸を加えて充分酸性にした後、元の10分の1程度まで溶液を濃縮して、更に濃塩酸を少量加えて、析出した白色沈澱を濾集した。収量 1.22 g (25.5 %, m.p. 175 - 177 °C)。

[L] 2-Bromo-6-nitrobenzamide の合成^{155, 156)}

2-Bromo-6-nitrobenzoic acid 1.22 g を無水ベンゼン 15 ml 中に懸濁し、チオニルクロライド (SOCl_2) 2.5 g を加えて 2 時間還流煮沸した。ベンゼンを留去し得られた暗緑色の油状物質 (2-bromo-6-nitrobenzoyl chloride) を、28 %アンモニア水溶液数 ml 中に氷冷攪拌しながら滴下した。水から再結晶して得られた結晶 800 mg (m.p. 185 - 195 °C) のうち 500 mg を 2N-水酸化ナトリウムで充分洗浄し、繰り返し水から再結晶して目的物を得た。収量 130 mg (17.1 %, m.p. 204 - 206 °C)。

[M] 2-Cyanobenzamide の合成^{157, 158)}

Phthalimide 5 g を濃アンモニア水溶液 30 - 40 ml 中に懸濁し、室温にて 2 時間攪拌して析出した結晶を濾集し、水洗して phthalimide 5.31 g (95.2 %; m.p. 219 - 220 °C) を得た。phthalimide 2.5 g を無水酢酸 10 g に懸濁し、2.5 時間還流煮沸した。氷冷後析出した結晶を濾集した後、無水酢酸、氷酢酸、エタノールで洗浄し、得られた結晶 570 mg (25.6 %; m.p. 170 - 174 °C) のうち 270 mg をエタノールから再結晶して目的とする 2-cyanobenzamide 230 mg (m.p. 171 - 174 °C) を得た。

[N] 2,6-Dibromobenzoyl-4-chlorophenylurea の合成

2,6-Dibromobenzamide 335 mg および *p*-chlorophenyl isocyanate 400 mg をキシレン 30 ml に溶解し、7 時間還流煮沸した。キシレンを留去し得られた結晶をエタノールから再結晶した。収量 189 mg (36.4 %)。

5-2 N-置換ベンゾイルフェニルウレア類の合成

(i) 1-Methyl-1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl)urea

2,6-Difluorobenzoyl-(4-chlorophenyl)urea 0.5 g (0.0018 mol)、水酸化カリウム 0.11 g をジメチルホルムアミド (DMF) 10 ml 中で攪拌しながらヨウ化メチル (CH_3I) 0.25 g を添加した。一晩攪拌した後、得られた結晶、および母液から酢酸エチルで抽出して得られた結晶を合わせてエタノールから再結晶した。収量 0.24 g (45.7 %).

(ii) 1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-methyl-3-(4-chlorophenyl)urea

p-Chloroaniline を無水酢酸でアセチル化し、更にヨウ化メチルでメチル化した後、6N塩酸で脱アセチル化した *p*-chloro-N-methylaniline 1.0 g (0.071 mol) を無水ベンゼン 20 ml に溶解し、そこに 2,6-difluorobenzoyl isocyanate 1.42 g を滴下した。5 - 6 時間攪拌した後得られた結晶をエタノールから再結晶した。収量 0.93 g (47.7 %).

(iii) 1-Methyl-1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-methyl-3-(4-chlorophenyl)urea

(ii) のようにしてフェニル側の-NH-をメチル化した後、続いて (i) の方法にしたがって、ベンゾイル側の-NH-をメチル化した。各種N置換ベンゾイルフェニルウレアの融点およびHPLCから求めた疎水性はTable 11に示した。

5-3 DEF (S,S,S-Tributylphosphorotriithioate)の合成¹⁵⁹⁾

細かく切り刻んだ金属ナトリウム 10.7 g (0.465 mol) を100 mlのトルエンに入れた後、*n*-butyl mercaptan 14 ml (11.7 g, 0.13 mol) を加えて、2 - 3 時間放置した。水素ガスの発泡がおさまった後、デカンテーションして不溶のナトリウムを除いた。次に、トルエン 20 ml にオキシ塩化リン (POCl_3) 8 ml (0.086 mol) を溶解したものを、前述した sodium *n*-butyl mercaptan のトルエン溶液に氷冷しながら滴下した。室温でしばらく攪拌したのち、さらに 50 - 70°C で1時間攪拌した。氷冷後、約1 mlの水を加えて残存しているナトリウムを水酸化ナトリウムにした後、水洗(3回)した。さらに希酢酸で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、トルエンを留去した後シリカゲルカラムクロマトグラフィー (WakoGel C-200, benzene/ethyl acetate=50/1) で精製した。収量 6.27 g (48.5 %).

第6章 総括

ベンゾイルフェニルウレア系殺虫剤の殺虫活性と *in vitro* における表皮形成阻害活性との関係を定量的に解析したところ、表皮形成阻害が殺虫活性発現の原因であることが明らかになるとともに、分子全体の疎水性が、薬物の輸送過程を支配するものであることが明確になった。代謝阻害剤の併用によって、フェニル部・ベンゾイル部共に電子供与性で置換された誘導体は酸化され易いこと、フェニル部に電子吸引性の特に強い比較的単純な置換基 (NO_2 , CN , COPh) が導入されると加水分解代謝を受け易いことが明らかになった。ベンゾイル側アミド結合の加水分解はオルト位の置換基で阻害されるが、モノフッ素体では顕著に加水分解を受けることがわかった。

ベンゾイル部およびフェニル部における置換基効果の定量的解析の結果、置換基の立体電子的性質がニカメイチュウおよびカイコに対する殺虫活性の発現に密接に関わっていることが明らかとなった。すなわち、ベンゾイル部においては、オルト位に電子吸引性および疎水性が高く、かつ立体的に小さい置換基が要求される。しかしながら、無置換体は代謝分解をかなり強く受けると考えられることから、高い殺虫活性を持つことはできない。一方、フェニル部に関しては、電子吸引性で疎水性の高い（最適値が存在する）、立体的には幅の狭い置換基の有効なことが明らかになり、置換基の結合軸方向における長さは、活性の変化にとってそれほど重要でないことが明らかになった。さらに、ニカメイチュウとカイコの間で、殺虫活性におよぼすフェニル部置換基の電子的効果は逆に働くことがわかった。

以上の定量的解析から得られた結果をまとめると Fig. 26 のようになる。

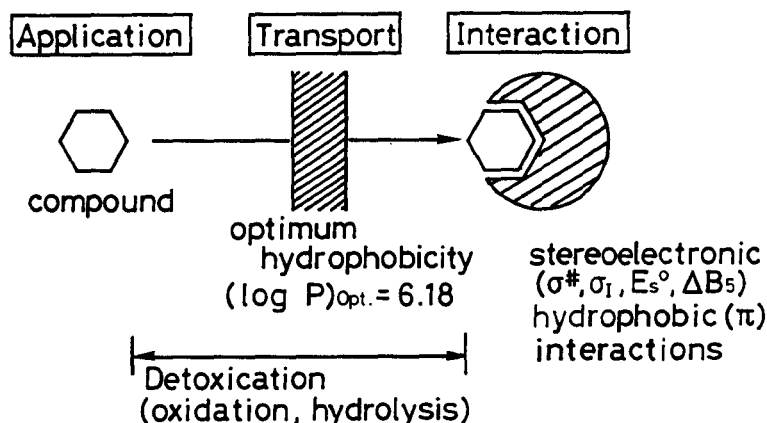


Fig. 26. Inferences from quantitative structure-activity study.

すなわち、投与された化合物は疎水性で支配される移行の過程を経て標的部位へ到達し、立体電子的および疎水相互作用によって活性をあらわす。移行の過程においては、主として置換基の電子的効果を受けやすい解毒代謝機構の存在することが示唆された。

また、定量的解析結果に基づいて高活性の予測される化合物をデザインしたところ、ジフルベンズロンの約5倍の殺虫活性を示す誘導体を得ることができた。また、ハスモンヨトウに対して強力な殺虫活性を有するクロルフルアズロン類縁体のニカメイチュウに対する殺虫活性もジフルベンズロンなど簡単な構造の化合物の殺虫活性と同一の基準で解析することができた。

ウレア骨格の-NH-をメチル化すると疎水性は大きく変化し、活性も著しく低下したものの、活性の残存することから-NH-水素の存在は重要であるが活性の発現にとって必須とは考えられない。

生化学的検討の結果、脱皮の誘導された表皮は、キチンの前駆体であるN-アセチルグルコサミンを取り込み、新しい表皮を形成することが明らかになった。糸状菌のキチン合成酵素阻害剤であるポリオキシシンおよび脱皮阻害剤ジフルベンズロンはともにN-アセチルグルコサミンの表皮への取り込みを阻害した。そして、ポリオキシシンはキチン合成酵素を阻害し、ジフルベンズロンはキチン生合成の次の段階であるクチクルの蓄積を阻害するものであることが示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり懇切なる御指導を賜った京都大学農学部教授藤田稔夫先生に心から感謝致します。研究全般にわたって御助言を頂いた農薬化学研究室岩村倣助教授、西村勁一郎博士、赤松美紀嬢、三芳秀人氏、および研究室の皆様には感謝の意を表します。本稿の第4章に関する研究は放射性同位元素総合センター内で行ったもので、その際御助言を頂いた栗原紀夫教授およびセンターの皆様には御礼申し上げます。物理化学定数の測定、生物検定において御協力を頂いた外松朋子嬢、赤木俊夫氏、松谷道子嬢、化合物の合成にあたり御助力を頂いた深見治一博士、児玉亨氏、神崎浩博士、西村淳氏、入江一浩氏、長谷川隆昭氏、木村隆氏、木下勝敏氏に御礼申し上げます。

ニカメイチュウの卵を快く提供して頂いた武田薬品農薬研究所京都試験農園の佐藤安夫博士、河野義明博士を始めとする研究所の皆様、貴重な化合物を提供して頂いた住友化学宝塚総合研究所、石原産業中央研究所、および科研製薬東京研究所の皆様には感謝致します。

大学院時代に御指導を賜りました京都大学名誉教授中島稔先生、ダイキン工業(株)北原克彦博士、京都大学化学研究所西岡孝明博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) R. H. Hackman, in "Biology of the Integument 1. Invertebrates"(J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy, and K. Sylvia Richards, Eds.), pp. 581 - 610, Springer Verlag, Berlin, 1984.
- 2) N. F. Hadley, *Scientific American*, 255, No. 1, 98(1986).
- 3) M. Sugumarann, W. J. Henzel, K. Mulligan, and H. Lipke, *Biochem.*, 21, 6509 (1982).
- 4) A. G. Richards, in "Biochemistry of Insects"(M. Rockstein, Ed.), pp. 205 - 232, Academic Press, London, 1978.
- 5) C. G. H. Steel and K. G. Davey, in "Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology"(G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, Eds.), Vol 8, pp. 1 - 35, Pergamon Press, Oxford, 1985.
- 6) L. M. Liddiford and J. W. Truman, in "Biochemistry of Insects"(M. Rockstein Ed.), pp. 307 - 357, Academic Press, London, 1978.
- 7) G. S. Clarke, B. C. Baldwin, and H. H. Rees, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 24, 220(1985).
- 8) W. S. Bowers, T. Ohta, J. S. Cleere, and P. A. Marsella, *Science*, 193, 542(1976).
- 9) G. B. Quistad, D. C. Cerf, D. A. Schooley, and G. B. Staal, *Nature*, 289, 176(1981).
- 10) C. A. Henrick, in "Insecticide Mode of Action"(J. R. Coats, Ed.), pp. 315 - 402, Academic Press, London, 1982.
- 11) A. Nakayama, H. Iwamura, A. Niwa, Y. Nakagawa, and T. Fujita, *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1034(1985).
- 12) E. kuwano, R. Takeya, and M. Eto, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 921(1983).
- 13) J. J. van Daalen, J. Meltzer, R. Mulder, and K. Wellinga, *Naturwissenschaften*, 59, 312(1972).
- 14) K. Wellinga, R. Mulder, and J. J. van Daalen, *J. Agric. Food Chem.*, 21, 993(1973).
- 15) C. H. Schaefer, T. Miura, W. H. Wilder, and F. S. Mulligan, *J. Econ. Entomol.*, 71, 427(1978).
- 16) G. Zoebelein, I. Hammann and W. Sirrenberg, *Z. Angew. Entomol.*, 89, 289(1980).
- 17) T. Haga, T. Toki, T. Koyanagi, and R. Nishiyama, *J. Pestic. Sci.*, 10, 217(1985).
- 18) H.-M. Becher, P. Becker, R. Prokic-Immel, W. Wirtz, *Abst. 10th Int. Congr. Plant Prot.*, 2C-S16, p. 408 - 415, 1983.
- 19) K. Wellinga, R. Mulder, and J. J. van Daalen, *J. Agric. Food Chem.*, 21, 348(1973).

- 20) C.-C. Yu and R. J. Kuhr, *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 134(1976).
- 21) L. C. Post and W. R. Vincent, *Naturwissenschaften*, **60**, 431(1973).
- 22) L. C. Post and B. J. Dejong and W. R. Vincent, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **4**, 473(1974).
- 23) L. C. Post and R. Mulder, in "Mechanism of Pesticide Action"(G. K. Kohn, Ed.), ACS Symp. Ser. Vol. 2, pp. 136 - 143, ACS, Washington D. C., 1974.
- 24) E. P. Marks and B. A. Sowa, in "Mechanism of Pesticide Action"(G. K. Kohn, Ed.), ACS Symp. Ser. Vol. 2, pp. 144 - 155, ACS, Washington D. C., 1974.
- 25) B. A. Sowa and E. P. Marks, *Insect Biochem.*, **5**, 855(1975).
- 26) E. P. Marks and B. A. Sowa, in "The Insect Integument"(H. R. Hepburn, Ed.), pp. 339 - 357, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- 27) A. Verloop and C. D. Ferrell, in "Pesticide Chemistry in the 20th Century"(J. R. Plimmer, Ed.), Vol. 37, pp. 237 - 270, Amer. Chem. Soc. Washington D. C., 1977.
- 28) R. F. Ker, *J. Insect Physiol.*, **23**, 39(1977).
- 29) L. Clarke, G. H. R. Temple, and J. F. V. Vincent, *J. Insect Physiol.*, **23**, 241(1977).
- 30) D. H. Deul, B. J. de Jong and J. A. M. Kortenbach, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **8**, 98(1978).
- 31) N. P. Hajjar and J. E. Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **11**, 33(1979)
- 32) M. J. Gijswijt, D. H. Deul, and B. J. DeJong, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **12**, 87(1979).
- 33) W. H. van Eck, *Insect Biochem.*, **9**, 295(1979).
- 34) T. Mitsui, C. Nobusawa, J. Fukami, J. Colins and L. M. Liddiford, *J. Pestic. Sci.*, **5**, 335(1980).
- 35) I. F. Turnbull and A. J. Howells, *Aust. J. Biol. Sci.*, **35**, 491(1982).
- 36) I. F. Turnbull and A. J. Howells, *Aust. J. Biol. Sci.*, **36**, 251(1983).
- 37) T. Mitsui, C. Nobusawa, and J. Fukami, *J. Pestic. Sci.*, **6**, 155(1981).
- 38) E. Cohen and J. E. Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **13**, 129(1980).
- 39) R. T. Mayer, A. C. Chen, and J. R. DeLoach, *Insect Biochem.*, **10**, 549(1980).
- 40) R. T. Mayer, A. C. Chen, and J. R. DeLoch, *Experientia*, **37**, 337(1981).
- 41) E. Cohen and J. E. Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **17**, 301(1982).
- 42) E. Cohen, *Europ. J. Cell Biol.*, **16**, 289(1982).
- 43) E. P. Marks, J. Balke, and H. Klosterman, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **1**, 225(1984).
- 44) S. C. Saxena and V. Kumar, *Ind. J. Exp. Biol.*, **19**, 1199(1981).
- 45) T. Leighton, E. P. Marks and F. Leighton, *Science*, **213**, 905(1981).
- 46) I. Ishaaya and J. E. Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **4**, 484(1974).
- 47) S. J. Yu and L. C. Terriere, *Life Sci.*, **17**, 619(1975).

- 48) S. J. Yu and L. C. Terriere, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 7, 48(1977).
- 49) M. P. O'Neill, G. M. Holman, and J. E. Wright, *J. Insect Physiol.*, 23, 1243(1977).
- 50) B. Becker, *J. Insect Physiol.*, 24, 699(1978).
- 51) J. Cl. Denneulin and M. Lamy, *Experientia*, 38, 800(1982).
- 52) N. Soltani, J. P. Delbecque, J. Delachambre, and B. Mauchamp, *International J. Invertebrate Reproduction and Development*, 7, 323(1984).
- 53) N. Mitlin, G. Wiygul, and J. W. Haynes, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 7, 559(1977).
- 54) J. R. DeLoach, S. M. Meola, R. T. Mayer, and J. Mark Thompson, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15, 172(1981).
- 55) N. Soltani, M. T. Besson, and J. Delachambre, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21, 256(1984).
- 56) S. M. Meola and R. T. Mayer, *Science*, 207, 985(1980).
- 57) M. Truchet, S. Lauverjat, M. Lamy, and J. C. Denneulin, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15, 253(1981).
- 58) W. R. Bishai and A. C. Stoolmiller, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 11, 258(1979).
- 59) C. Hansch and T. Fujita, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1616(1964).
- 60) K. J. Kramer and H. E. Mcgrgor, *Environ. Entomol.*, 8, 274(1974).
- 61) C. H. Schaefer, T. Miura, and W. H. Wilder, *J. Econ. Entomol.*, 74, 658(1981).
- 62) K. J. Kramer and H. E. McGregor, *J. Kansas Entomol. Soc.*, 53, 627(1980).
- 63) A. Retnakaran, *J. Econ. Enomol.*, 73, 520(1980).
- 64) J. Granett, B. Bisabri-Ershadi, and M. J. Hejazi, *J. Econ. Entomol.*, 76, 399(1983).
- 65) T. J. Kelly, R. E. Redfern, A. B. DeMilo, and A. B. Borkovec, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 17, 35(1982).
- 66) A. B. DeMilo, R. E. Redfern, and A. B. Borkovec, *J. Agric. Food Chem.*, 31, 713(1983).
- 67) R. E. Redfern, T. J. Kelly, A. B. Borkovec, and D. K. Hayes, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 18, 351(1982).
- 68) L.-E. K. Pedersen, A. Svendsen, and P. D. Klemmensen, *Pest. Sci.*, 25, 462(1984).
- 69) M. Boeger, J. Drabek, R. Neumann (Ciba-Geigy A.-G.), *Brit. UK Pat. Appl.* GB 2145716, 1985.
- 70) K. Taninaka, H. Kurono, T. Hara, and K. Murata, *J. Pesticide Sci.*, 1, 115(1976).
- 71) S. Moriya, Y. Maeda, T. Yonekubo, and K. Asakawa, *Appl. Ent. Zool.*, 21, 220(1977).
- 72) M. Fukada and T. Miyake, *Appl. Ent. Zool.*, 22, 191(1978).
- 73) M. Uchida, T. Asai, and T. Sugimoto, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1233(1985).

- 74) Y. Izawa, M. Uchida, T. Sugimoto, and T. Asai, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **24**, 343(1985).
- 75) M. Uchida, Y. Izawa, and T. Sugimoto, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1913(1986).
- 76) M. Uchida, Y. Izawa, and T. Sugimoto, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 71(1987).
- 77) 中川 好秋, 藤田 稔夫, 化学, **41**, 194(1986).
- 78) C. A. Henrick, W. E. Willy, and G. B. Staal, *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 353(1973).
- 79) 杉浦哲也, 植物防疫, **38**, 303(1984).
- 80) Y. Sato, *Appl. Entomol. Zool.*, **10**, 6(1952).
- 81) S. Ishii, *Entomophaga*, **16**, 165(1971).
- 82) 釜野静也, 農技研報 C, **27**, 1(1973).
- 83) J. E. Casida, *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 753(1970).
- 84) 釜野静也, 湯嶋健, 植物防疫, **23**, 353(1969).
- 85) a) D. J. Finney, in "Probit Analysis," Cambridge Univ. Press, London, 1952. b) J. H. Goodnight, in "SAS user's guide," (J. T. Helwig and K. A. Council, Eds.), pp. 357 - 360, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 1979.
- 86) C. Hansch and A. J. Leo, in "Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology", Wiley, New York, 1979.
- 87) M. Charton, *Prog. Phys. Org. Chem.*, **13**, 119(1981).
- 88) N. V. Hayes and G. E. K. Branch, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1555(1943).
- 89) O. Exner, in "Advances in Linear Free Energy Relationship" (N. B. Chapman and J. Shorter Eds.), p. 27, Plenum Press, London, 1972.
- 90) H. H. Jaffe and H. L. Jones, *Adv. Heterocycl. Chem.*, **3**, 209(1964).
- 91) C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, and R. M. Muir, *Nature*, **194**, 178(1962).
- 92) T. Fujita, J. Iwasa, and C. Hansch, *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 5175(1964).
- 93) T. Fujita, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 285(1983).
- 94) K. Miyake and H. Terada, *J. Chromatography*, **157**, 386(1978).
- 95) K. Miyake and H. Terada, *J. Chromatography*, **240**, 9(1982).
- 96) C. Yamagami, H. Takami, K. Yamamoto, K. Kiyoshi, and N. Takao, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4994(1984).
- 97) Y. Nakagawa, T. Sotomatsu, K. Irie, K. Kitahara, H. Iwamura, and T. Fujita, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 143(1987).
- 98) T. Sotomatsu, Y. Nakagawa, and T. Fujita, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 156(1987).
- 99) A. Verloop, in "Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment" (J. Miyamoto and P. C. Kearney, Eds.), Vol. 1, pp. 339 - 344, Pergamon, Oxford, 1983.
- 100) T. Sotomatsu and T. Fujita, *J. Org. Chem.*, submitted.
- 101) G. D. Pimprakar and G. P. Georghiou, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **12**, 10(1979).

- 102) G. D. Pimprikar and G. P. Georghiou, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 615(1982).
- 103) T. Fujita and T. Nishioka, *Prog. Phys. Org. Chem.*, **12**, 49(1976).
- 104) G. J. Bijloo and R. F. Rekker, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **3**, 91(1984).
- 105) G. J. Bijloo and R. F. Rekker, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **3**, 111(1984).
- 106) D. L. Bull and G. W. Ivie, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **13**, 41(1980).
- 107) S. C. Chang, *J. Econ. Entomol.*, **71**, 31(1978).
- 108) S. C. Chang and J. B. Stokes, *J. Econ. Entomol.*, **72**, 15(1979).
- 109) G. D. Pimprikar and G. P. Georghiou, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 618(1982).
- 110) G. W. Ivie, *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 81(1978).
- 111) J. C. Opdycke, R. W. Miller, and R. E. Menzer, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1223(1982).
- 112) J. C. Opdycke, R. W. Miller, and R. E. Menzer, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1227(1982).
- 113) G. W. Ivie and J. E. Wright, *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 90(1978).
- 114) C. O. Knowles and A. K. Gayen, *J. Econ. Entomol.*, **75**, 833(1982).
- 115) G. G. Still and R. A. Leopold, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **9**, 304(1978).
- 116) A. E. AbdelMonem and R. O. Mumma, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 536(1982).
- 117) G. W. Ivie, D. L. Bull, and J. A. Veech, *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 330(1980).
- 118) R. L. Metcalf, P.-Y. Lu, and S. Bowlus, *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 359(1975).
- 119) W. B. Nimmo, P. C. de Wilde, and A. Verloop, *Pestic. Sci.*, **15**, 574(1984).
- 120) W. B. Nimmo, A. G. M. Willems, K. D. Joustra, and A. Verloop, *Pestic. Sci.*, **17**, 403(1986).
- 121) S. L. Seufferer, H. D. Braymer, and J. J. Dunn, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **10**, 174(1979).
- 122) J. Granett and M. J. Hejazi, *J. Econ. Entomol.*, **76**, 403(1983).
- 123) P. Massardo, F. Bettarini, G. Giovarruscio, P. Gabriele, F. Reggiori, V. Caprioli, A. Longoni (Montedison S.p.A.), *Eur. Pat. Appl.* EP 124052, 1984.
- 124) R. J. Sbragia, B. Bisabri-Ershadi, and R. H. Rigtterink, *Abst. 10th Int. Congr. Plant Prot.*, 2C-S17, pp. 418 - 424, 1983.
- 125) CLOGP program, Med.Chem Software Manual, V. 3.33, Medicinal Chemistry Project, Pomona College, Claremont, CA, March 1985.
- 126) 福田紀文、須藤光正、樋口芳吉、*日本蚕糸学雑誌*, **29**, 1(1960).
- 127) T. Akagi, Y. Nakagawa, H. Iwamura, and T. Fujita, Unpublished.
- 128) N. Agui, *Appl. Entomol. Zool.*, **8**, 236(1973).
- 129) N. Agui, *Memoirs of the Fac. Agric. Tokyo Univ. Educ.*, **22**, 173(1976).
- 130) T. Nishioka, T. Fujita, and M. Nakajima, *J. Pestic. Sci.*, **4**, 367(1979).
- 131) K. Kitahara, Y. Nakagawa, T. Nishioka, and T. Fujita, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1583(1983).

- 132) J. G. Carlson, *Biol. Bull.*, **90**, 109(1946).
- 133) T. D. C. Grace, *Nature*, **195**, 788(1962).
- 134) R. Neumann and W. Guyer, *Abst. 10th Int. Congr. Plant Prot.*, 2S-S21 pp. 445 - 451, 1983.
- 135) A. C. Grosscurt and J. Tipker, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **13**, 249(1980).
- 136) N. Ohta, K. Kakiki, and T. Misato, *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1224(1970).
- 137) K.-D. Spindler, R. Keller, J. D. O'Connor, in "Progress in Ecdysone Research" (J. Hoffmann Ed.), p. 247 - 280, Elsevier, Amsterdam, 1980.
- 138) M. N. Horst, *J. Biol. Chem.*, **256**, 1412(1981).
- 139) 草間慶一, トレーサー実験法—上—生化学実験講座(日本生化学会編), 東京化学同人, pp. 41 - 226, 1977.
- 140) 長谷川金作, 昆虫変態の生理化学, 南江堂, 1979.
- 141) M. Ashburner, *Nature New Biol.*, **230**, 222(1977).
- 142) H. Gronemeyer, O. Pongs, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 2108(1980).
- 143) G. Korge, *Chromosoma*, **62**, 155(1977).
- 144) M. Ashburner, C. Chihara, P. Meltzer, G. Richard, *Cold Spring. Harbor Symp. Quant. Biol. Bio.*, **38**, 655(1974).
- 145) Y. Izawa, M. Uchida, and M. Yasui, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1369(1986).
- 146) Y. Tsuzuki, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **17**, 102(1942).
- 147) J. P. Dunn, D. M. Green, P. H. Nelson, W. H. Rooks II, A. Tomolonis, and K. G. Untch, *J. Med. Chem.*, **20**, 1557(1977).
- 148) G. Holt and B. Pagdin, *J. Chem. Soc.*, 2508(1960).
- 149) B. Cross, P. P. Hoffman, G. T. Santora, D. M. Spatz, and A. R. Templeton, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 260(1983).
- 150) H. T. Clarke and R. R. Read, in "Organic Syntheses"(H. Gilmann, Ed.), Coll. Vol. 1, p. 514, Wiley, New York, 1967.
- 151) A. Russell and W. G. Tebbens, in "Organic Syntheses"(E. C. Horning, Ed.), Coll. Vol. 3, p. 293, Wiley, New York, 1965.
- 152) L. K. Dyal and K. H. Pausacker, *Aust. J. Chem.*, **11**, 491,(1958).
- 153) H. T. Clarke and E. R. Taylor, in "Organic Syntheses"(R. H. Blatt, Ed.), Coll. Vol. 2, p. 135, Wiley, New York, 1966.
- 154) J. B. Cohen and C. J. Smithells, *J. Chem. Soc.*, 105, 1907(1914).
- 155) B. Helferich and W. Schaefer, in "Organic Syntheses"(H. Gilmann, Ed.), Coll. Vol. 1, p. 147, Wiley, New York, 1967.
- 156) J. J. Sudborough, *J. Chem. Soc.*, **67**, 587(1985).
- 157) O. Aschan, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **19**, 1398(1886).
- 158) A. Braun and T. Tcherniac, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **40**, 2709(1907).
- 159) F. X. Markley, *Chem. Abst.* **55**, 9772(1965).

論文発表

- 1) K. Kitahara, Y. Nakagawa, T. Nishioka and T. Fujita, Cultured integument of *Chilo suppressalis* as a bioassay system of insect growth regulators, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1583(1983).
- 2) Y. Nakagawa, K. Kitahara, T. Nishioka, H. Iwamura, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. I. Effect of substituents at aniline moiety against *Chilo suppressalis* Walker, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **21**, 309(1984)
- 3) Y. Nakagawa, H. Iwamura, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. II. Effect of benzyloxy substituents at aniline moiety against *Chilo suppressalis* Walker, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **23**, 7(1985).
- 4) Y. Nakagawa, T. Sotomatsu, K. Irie, K. Kitahara, H. Iwamura, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. III. Effects of substituents at the benzoyl moiety, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 143(1987).
- 5) T. Sotomatsu, Y. Nakagawa, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. III. Benzoyl *ortho* substituent effects and molecular conformation, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 156(1987).
- 6) Y. Nakagawa, T. Akagi, H. Iwamura, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. V. Substituted-pyridyloxy-phenyl and related derivatives, *Pestic. Biochem. Physiol.*, in press.
- 7) T. Akagi, Y. Nakagawa, H. Iwamura, and T. Fujita, Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. VI. Effect of substituents at aniline moiety against *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*, in preparation.
- 8) Y. Nakagawa, M. Matsutani, N. Kurihara, and T. Fujita, Effect of benzoyl-phenylureas on the incorporation of N-acetylglucosamine in the cultured integument system, in preparation.

- 9) 中川好秋, 藤田稔夫, 昆虫の脱皮を阻害する殺虫剤, 化学, 41, 194(1986).
- 10) Y. Nakagawa, E. Kuwano, M. Eto, and T. Fujita, Effects of insect-growth-regulatory benzimidazole derivatives on cultured integument of the rice stem borer and mitochondria from rat liver, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3569(1985).
- 11) A. Nakayama, H. Iwamura, A. Niwa, Y. Nakagawa, and T. Fujita, Development of insect juvenile hormone active oxime *O*-ethers and carbamates, *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1034(1985).